Über eine den Luftstickstoff assimilierende Hefe: Torula Wiesneri

von

Dr. **Heinrich Zikes,**

Privatdozent der Bakteriologie an der k. k. Wiener Universität.

Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Wiener Universität.

(Vorgelegt in der Sitzung am 29. April 1909.)

Vor den epochalen Entdeckungen Hellriegel's (1) und Wienogradsky's (2) sowie anderer, daß es Spaltpilze gibt, welche den freien Stickstoff der Luft zu assimilieren vermögen, war die Ansicht allgemein verbreitet, daß die höhere Pflanzenwelt ihren Stickstoffbedarf nur aus der Erde, und zwar nur aus anorganischen Stoffen beziehen kann.

Der unermeßlich große Gehalt der Luft an elementarem Stickstoff schien für das Pflanzenleben keine Rolle zu spielen. Es war die Ansicht verbreitet, daß die Erde durch die pflanzliche Vegetation immer ärmer an stickstoffhaltigen Substanzen wird und daß dieser ständigen Abnahme nur durch gründliche Düngung abgeholfen werden kann. Dazu kam die Beobachtung, daß zahlreiche Mikroorganismen in der Erde hausen, welche den Stickstoffgehalt daselbst geradezu verringern, indem sie wie z. B. die Fäulniserreger bei der Zersetzung von Eiweißsubstanzen Ammoniak abspalten oder wie die denitrifizierenden Bakterien bei der Desoxydation von Nitraten und Nitriten freien elementaren Stickstoff zur Abscheidung bringen, welche gasförmigen Körper fort und fort aus der Erde entweichen und in die Atmosphäre gelangen. Nichtsdestoweniger sah man aber selbst in einem Boden, dem jahrelang keine stickstoffhaltigen Substanzen zugeführt wurden, die in und auf der Erde lebenden Organismen keinen Mangel daran leiden. Es mußten daher

diese beständig vor sich gehenden Abgänge von Stickstoffsubstanz wieder ersetzt werden, ohne daß hiebei eine künstliche Düngung in Frage kommt. Die Tatsache, daß Ammoniak, salpetrige Säure und Salpetersäure in Salzform aus der Atmosphäre der Erde zugeführt werden, war schon lange bekannt. Diese Mengen sind aber in keiner Weise ausreichend, das Manko an Stickstoff in der Erde zu ersetzen, welches einerseits durch die höhere Pflanzenwelt selbst der Erde jahraus, jahrein entzogen wird, andrerseits durch die zersetzende Wirkung von Mikroorganismen, die oben angedeutet wurde, resultiert.

Kühn (3) war einer der ersten, der annahm, daß die der Erde auf eine oder die andere Weise entrissene Stickstoffmenge derselben durch Bodenbakterien wieder teilweise zugeführt werde, indem sie freien atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren vermögen.

Henry (4) führt die Stickstoffzufuhr im Waldboden weiters auf mannigfache an den Laubblättern sitzende und anhaftende Mikroben zurück, die mit den Laubblättern im Herbste zu Boden fallen und so mit ihrem Erweißgehalt die Stickstoffmenge der Walderde vermehren helfen.

Henry brachte dürre Blätter von jungen Eichen und Buchen in metallene Kästen, deren Böden mit Kalkstein- oder Sandsteinplatten ausgelegt und deren obere Öffnungen mit Drahtgitter bedeckt waren. Diese Kästen setzte er 60 *cm* über dem Boden frei der Luft aus. Nach einem Jahre war der Stickstoffgehalt der Eichenblätter von 1·108 auf 1·923 %, also um 0·815 % der Trockensubstanz, der Buchenblätter von 0·947 auf 2·246 %, also um 1·299 % der Trockensubstanz gestiegen. Die Gesamtmasse der Eichenblätter hatte sich in dieser Zeit um 21·62 %, die der Buchenblätter um 23·01 % vermindert.

Nimmt man nun den ungünstigsten, sehr unwahrscheinlichen Fall an, daß das Gewicht sich nur durch Verschwinden der N-freien Stoffe (Zellulose, Stärke) vermindert habe und daß durch Regenwasser keinerlei lösliche Stickstoffverbindungen fortgeführt wären, so würde sich der beim Abschluß des Versuches gefundene Stickstoffgehalt, auf das ursprüngliche Gewicht der Blätter bezogen, für die Eichenblätter auf 1·508 %, für die Buchenblätter auf 1·727 % reduzieren. Folglich beträgt

der absolute Stickstoffgewinn der Eichenblätter 0·4%, der der Buchenblätter 0·78%.

Die ein Jahr der Luft ausgesetzten Blätter sind also relativ doppelt so reich an Stickstoff als zur Zeit des Abfalles von den Bäumen und auch die absolute Stickstoffzunahme ist merklich. Wenn der Boden, nach Henry's Ausführungen im Herbst pro Hektar 3300 *kg* dürre Blätter empfängt, so beträgt der absolute Stickstoffgewinn für diese Fläche durch Eichenblätter 13 *kg*, durch Buchenblätter 22 *kg*. Diese für die Stickstoffbilanz des Waldes sehr wesentliche stickstoffbindende Fähigkeit der abgefallenen Blätter führt Henry, wie bereits bemerkt, auf niedere Organismen zurück. Montemartini (5) fand gleichfalls, daß vom Dezember bis Mai in abgefallenen Platanenblättern der N-Gehalt von 1·2 auf 1·4%, in Erlenblättern von 1·4 auf 1·75% steigt. Süchting (6) hat im Jahre 1905 an der Marburger landwirtschaftlichen Versuchsstation eine Arbeit zur Durchführung gebracht, in welcher er das Vorkommen stickstoffprototropher Organismen auf den Blättern verschiedener Laubbäume nachweisen konnte, darunter auch angeblich solche vom anaeroben Typus des *Clostridium pastorianum.*

Auch Wiesner beschäftigt sich in einer im gleichen Jahre erschienenen vorläufigen Mitteilung: »Die biologische Bedeutung des Laubfalles« mit dieser Frage. Seinen Ausführungen ist folgendes zu entnehmen: »Die Kenntnis der Vermittlung des Bestandes der Bodenorganismen durch das fallende Laub scheint ein Gegenstand von großem Interesse zu sein. Es ist wohl nicht daran zu zweifeln, daß dem Boden durch das fallende Laub eine enorme Menge von Mikroorganismen zugeführt werde, welche wahrscheinlich in mehr oder minder hohem Grade der Pflanzenernährung dienen. Diese in der Atmosphäre reichlich vorkommenden Organismen werden offenbar durch die Luftbewegungen stark vertragen. Aber an den Laubblättern der Bäume sammeln sich die Mikroorganismen wie auf einem Filter an. Sie sammeln sich zum größten Teile gerade dort an, wo sie für den Baum durch Vermittlung des Laubes nutzbringend sind, nämlich auf dem Boden, auf welchem er steht. Es ist auch zu beachten, daß die Fläche der Blätter, welche hier als Filter wirkt, im Vergleiche zur Grundfläche des

Baumes eine sehr große ist. Bei Platanen mittlerer Größe betrug nach meiner Schätzung das beiläufige Verhältnis von Grundfläche zur Blattfläche 1 : 200, bei einer im Gartengrund freistehenden Buche 1 : 450, bei Pyramidenpappeln etwa 1 : 500 bis 1000. Diese Zahlen lassen annehmen, daß eine außerordentlich große Menge von Mikroorganismen durch das fallende Laub dem Boden zugeführt wird.«

Auf Grund dieser Erwägungen habe auch ich mich über Anregung Hofrats Professors Dr. Wiesner's mit diesem Gegenstande beschäftigt und bereits einige größere Versuchsreihen angestellt, die zur Klarlegung der Frage führen sollten, ob auf den Laubblättern verschiedener Bäume nicht Organismen zu finden sind, welche den Luftstickstoff zu assimilieren vermögen.

Bei dem Umfange des Stoffes und infolge noch durchzuführender zahlreichen weiteren Detailbestimmungen bin ich derzeit noch nicht in der Lage, über diese Untersuchungen im allgemeinen zu berichten, sondern will ich mich in vorliegender Arbeit nur auf die Beschreibung eines Mikroben, eines Sproßpilzes, genauer gesagt, beschränken, dem die Eigenschaft, wenn auch nicht im hohen Maße innewohnt, den freien atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren. Ich fand diese Hefe, wie ich gleich hier kurz mitteilen will, in ziemlich großer Menge auf den Blättern eines Lorbeerbäumchens, das mir für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde.

Bevor ich jedoch an diese meine nähere Aufgabe herantrete, erachte ich es für notwendig, einen kurzen Überblick über die stickstoffassimilierenden Organismen zu geben, und will ich mich speziell auf die Besprechung solcher Arbeiten beschränken, in denen von einer Entdeckung solcher Mikroben die Rede ist. Die Literatur wurde in dieser Richtung bis in die allerneueste Zeit verfolgt und dürfte die folgende Zusammenstellung ein ziemlich übersichtliches Bild über die Entdeckung neuer stickstoffprototrophen, namentlich freilebenden oligonitrophilen Organismen bringen.

Zuerst war es Berthelot (7), welcher indirekt den Beweis erbrachte, daß es Organismen geben müsse, welche den freien Stickstoff der Luft zu binden vermögen. Er fand bei seinen sehr

genau geführten Versuchen, daß der Stickstoffgehalt in der Erde sich allmählich anreichert, daß aber in derselben Erde keine N-Anreicherung stattfindet, wenn dieselbe zuvor auf 100° erhitzt wurde. Wie groß die Stickstoffbindung im Boden durch niedere Organismen ist, erhellt aus folgenden durch Berthelot ermittelten Zahlen: 50 *kg* lufttrockene Erde nahmen bei dem einen Versuch um 10 *g* N, bei einem anderen sogar um 23 *g* N zu. Ähnliche Resultate erzielten auch Dehérain (8) und Tacke (9). Durch diese Versuche wurde erwiesen, daß in der Erde tatsächlich N-bindende Organismen vorhanden sind. Die Antwort auf die Frage aber, welcher Art diese Lebewesen sind, blieben uns diese Forscher schuldig. Zuerst verdankten wir dem bekannten Bakteriologen Winogradsky (10) die Kenntnis einer Bakterienart, welche in ganz hervorragender Weise an der Stickstoffassimilation beteiligt ist. Er fand die anaerob und frei in der Erde wachsende Bakterienform *Clostridium pastorianum*, welche sich neben der Stickstoffbindung noch durch Produktion von Buttersäure aus Kohlehydraten auszeichnet. Diese Bakterienart produziert aus 1 *l* stickstofffreier Kulturflüssigkeit, welche die nötige Menge Nährsalze und 40 *g* Dextrose enthält, nach 20 Tagen gegen 54 *mg* N. Außer diesen Buttersäurebakterien fand Winogradsky noch eine zweite etwas größere Form, welche sich mit Jod blau färbt. Dieser Forscher hat dann später eine größere Anzahl weiterer Bodenbakterien auf Stickstoffbindung geprüft, aber hiebei keine weiteren positiven Erfolge erzielt.

Im Gegensatz zu Winogradsky ist es später Beijerinck (11) gelungen, andere in der Erde freilebende stickstoffassimilierende Spaltpilze zu finden, welche dem aeroben Typus angehören. Beijerinck ist der Meinung, daß die Anzahl der stickstoffprototrophen Organismen eine ziemlich große ist, auch unterscheidet er die Mikroben in bezug auf Genuß von Stickstoffverbindungen in *oligonitrophile, meso-* und *polynitrophile.* Unter »*Oligonitrophile*« versteht Beijerinck diejenigen Mikroben, die bei freier Konkurrenz mit der übrigen Mikrobenwelt sich in Nährmedien entwickeln, ohne daß absichtlich Stickstoffverbindungen zugefügt werden, aber auch ohne daß Fürsorge getroffen wird, die letzten Spuren dieser Verbindungen zu

entfernen. Sie haben das Vermögen, den freien atmosphärischen Stickstoff binden und zu ihrer Ernährung verwenden zu können. Bei der Reinkultur der *Oligonitrophilen* ergibt sich, daß die gewöhnlichen saprophytischen, d. h. von abgestorbenen Resten und leblosen organischen Stoffen sich ernährenden Bakterien, deren Keime in dem betreffenden Infektionsmateriale massenhaft vorkommen, in den Rohkulturen der *Oligonitrophilen* kaum oder gar nicht zur Entwicklung gelangen, offenbar infolge der unzureichenden Stickstoffnahrung. Dieselben werden von Beijerinck »*polynitrophil*« genannt; andere Arten nehmen in bezug auf Stickstoffernährung eine intermediäre Stellung ein und werden von Beijerinck als *mesonitrophil* bezeichnet.

Beijerinck konstatierte *Oligonitrophilie* im Lichte bei *Cyanophyceen* und im Dunkel bei einigen weiteren Bakteriaceen. Er bediente sich zur Feststellung der Stickstoffbindung bei ersteren folgender Versuchsanordnung: Er brachte in große Glaskolben von etwa 3 *l* Inhalt eine sterilisierte Lösung von saurem phosphorsauren Kali in destilliertem Wasser, und zwar in dem Verhältnis 0·02 : 100, zu welcher Flüssigkeit er 1 bis 2 *g* Gartenerde fügte, welche im lufttrockenen Zustand 0·56 % Stickstoff enthielt. In dieser Kulturflüssigkeit, welche nur die genannte Menge von Stickstoff enthielt, beobachtete er eine kräftige Zunahme verschiedener *Cyanophyceen*.

Es entstehen in dieser Lösung, in welche zeitweise von Stickstoffsalzen völlig befreite Luft geleitet wurde, zuerst an der Gefäßwand einzelne Kolonien, später treibende Häute hauptsächlich aus einer *Anabaena*-Art, *Anabaena catenula*, bestehend. Später entwickeln sich dunkelblaugrüne Häute, die aus einer *Nostoc palludosum* verwandten oder identischen Art bestehen. Selten finden sich blaugrüne Schleimklumpen von *Nostoc sphaericum*. Alle diese Arten gehören zu den unbeweglichen *Cyanophyceen*. Dagegen gelang es Beijerinck nicht, bewegliche Arten unter diesen Kulturbedingungen zu züchten, wie *Oscillaria*, *Spirulina*, da diese Organismen zu ihrem Körperaufbau merkliche Quantitäten von Stickstoffverbindungen benötigen und freien Stickstoff nicht zu binden vermögen. Beijerinck schließt aus diesen Versuchen auf die Befähigung der genannten Organismen, freien Stickstoff zu assimilieren,

ohne jedoch dafür Beleganalysen gebracht zu haben. Die interessante Tatsache, daß *Cyanophyceen* als erste Besiedler der vulkanischen Asche auf der durch die vulkanischen Ausbrüche verwüsteten Insel Krakatau von Treub beobachtet wurden, führt Beijerinck zu der Vermutung, daß die von anderen Himmelskörpern zugeführten, zuerst sich auf der Erde verbreiteten Pflanzen *Cyanophyceen* waren, da diese Organismen infolge ihrer Fähigkeit, Kohlensäure und N zu assimilieren, ihre Körpersubstanz auch auf totem Gestein aufzubauen vermögen. Aus den Beobachtungen Treub's braucht aber nicht geschlossen zu werden, daß *Cyanophyceen* freien Stickstoff binden, da ja auch stickstoffassimilierende Bakterien neben den *Cyanophocyceen* gewachsen sein können. Überhaupt bedarf es bei der Stickstoffbindung durch diese Algengruppe noch sehr der exakten Beweisführung. Beijerinck fand ferner bei Kulturversuchen im Dunkel, und zwar in 2% Mannitlösungen in Leitungswasser, welchen geringe Spuren von saurem phosphorsauren Kali zugefügt wurden, daß zwei Bakterienarten kräftige Stickstoffbindung innewohnt, nämlich *Azotobacter chroococcum*, allgemein in Gartenerde sehr verbreitet, von welchem er drei Varietäten unterscheidet, davon zwei in Erde, eine dritte im Grabenwasser, ferner *Azotobacter agilis*, sehr verbreitet im Kanalwasser zu Delft. In einer späteren Arbeit, welche Beijerinck mit van Delden (12) publizierte, negierte er die Stickstoffprototrophie dieser Bakterien in Reinzucht, berichtete aber, daß Stickstoffbindung bei diesen Bakterien eintritt, wenn *Azotobacter* in Symbiose mit *Aerobacter aerogenes* oder mit *Granulobacter* oder mit *Bacillus radiobacter* vorkommt.

Koch (13) und Kröber haben dann später festgestellt, daß *Azotobacter chroococcum* auch für sich allein N zu binden vermag, was einerseits Gerlach und Vogel (14), andrerseits Freudenreich (15) sowie andere bestätigen konnten.

Viel kräftiger erscheint aber die Stickstoffbindung des *Azotobacter* zu sein, wenn er mit den genannten Synergeten, namentlich mit *Radiobacter* in demselben Boden vorkommt, wie dies neuerer Zeit von Stocklasa bestätigt wurde. Dieses Zusammenleben bietet speziell dem *Azotobacter* große Vorteile. In einem Boden, in welchem Nitrate in größerer Menge vor-

kommen, kann sich der *Azotobacter* allein weder gut ernähren, noch auch gut vermehren, da für ihn die Salpetersäure eine sehr minderwertige Stickstoffquelle ist. Der *Radiobacter* hingegen findet in der Salpetersäure die beste Nährquelle, welche er bei der Assimilation dann derart zersetzt, daß elementarer Stickstoff entsteht und dieser für *Azotobacter* im status nascendi die trefflichste Stickstoffnahrung abgibt. *Radiobacter* baut also die Nitrate zu elementarem Stickstoff ab, welches Element *Azotobacter* zum Aufbau seines Körpereiweißes benützt.

Löhnis (16*a*) fand, daß außer *Clostridium pastorianum* und den *Azotobacter*-Arten noch *Bacterium pneumoniae, Bacterium lactis viscosum, Bacterium radiobacter, Bacterium radicicola, Bacterium prodigiosum* und *Bacterium turcosum* Stickstoff zu binden vermögen. In einer ganz neuen Arbeit haben Löhnis (16*b*) und Westermann eine größere Anzahl *Azotobacter*-Stämme einer vergleichenden Untersuchung auf Stickstoffbindung unterzogen und eine neue Art *Bacillus danicus* als stickstoffbindend erkannt. Sie unterscheiden 4 Typen des *Azotobacter*.

1. *Azotobacter chroococcum,* ausgezeichnet durch braune bis schwarze Verfärbung der Beläge auf festen Substraten und der oberflächlichen Ansammlungen in Lösungen.

2. *Azotobacter Beijerinckii* mit schwefelgelber Verfärbung im Sarcinastadium.

3. *Azotobacter agile* fluoreszierend und lebhaft beweglich.

4. *Azotobacter vitreum* stets unbeweglich, nur in Kugelform auftretend, auf verschiedenen Nährböden durchscheinende glasige Schleimmassen produzierend.

Lippmann (17) hat bei einem *Azotobacter vinilandi* genannten Spaltpilz gleichfalls starke Stickstoffassimilation beobachtet und tritt dieser Organismus in mehr coccenartigen zu Paketen vereinigten Formen auf. Perotti (18) hat in der römischen Campagna eine neue Art von Stäbchen, *Pseudomonas leuconitrophilus* entdeckt, die sich jedoch nur durch eine schwache Stickstoffbindung auszeichnet. Pillai (19) untersuchte indische Reisfelderde, welche von der Malabarküste aus der Nähe von Trawankur stammte, auf ihren Gehalt an stickstoffbindenden Organismen. Auf den nahezu stickstofffreien

Mannitagarplatten entwickelten sich Kolonien von *pneumonie*-artigen Organismen, eine Beobachtung, welche Löhnis bei der Untersuchung deutscher Erde aus der Nähe Leipzigs gleichfalls gemacht hatte. Ferner kam es zur Entwicklung einer neuen Art in geringer Zahl, welche *Bacillus malabarensis* genannt wurde und die sich durch rotgefärbte unregelmäßig unrandete Kolonien auszeichnet. — Diese Art dominierte dagegen auf Traubenzuckeragar, daneben traten Kolonien von *Micrococcus sulfureus,* sowie Kolonien von *Bacillus subtilis* auf. Auf Tartratagar kamen wieder Kolonien von *Bacterium turcosum*, beziehungsweise *chrysogloea* zur Entwicklung. Bei anaerober Züchtung entstanden aus der Mannitlösung typische *Pneumonie*-Formen, aus der Traubenzuckerlösung zwei *Radiobacter*-Varietäten, aus der Tartratlösung ein dem *Bacterium lipsiense* nahestehender *Pneumonie*-Stamm, sowie eine gasbildende braungelb wachsende Art, die mit *Bacterium tartaricum* bezeichnet wurde. Über die Stickstoffassimilation der genannten Bakterien äußert sich Pillai folgendermaßen: *Bacillus subtilis* und *Bacterium lipsiense* sind nicht in wahrnehmbarem Grade zur Stickstoffbindung befähigt, *Bacterium tartaricum* und *Bacterium radiobacter* absorbieren nur geringe Stickstoffmengen, dagegen gehören *Bacterium turcosum*, *chrysogloea* und *Bacillus malabarensis* nach Ansicht des Verfassers zu den oligonitrophilen Organismen mit ziemlich bedeutender Stickstoffbindung. Recht ansehnlich erwiesen sich die Stickstoffbindungsmengen durch die *Pneumonie*-Stämme, ebenso durch *Micrococcus sulfureus.* Der Verfasser betonte schließlich, daß in dieser Erde das allgemein verbreitete *Azotobacter chroococcum* fehlt, dafür *pneumonie*-artige Organismen in größerer Menge auftraten. De Kruyff (20) isolierte aus der Erde von der Insel Krakatao ein gleich dem *Micrococcus sulfureus* und *malabarensis* gelbwachsendes Bakterium, *Bacterium krakataui*, welches ähnlich wie die genannten pro Gramm Zucker einen Stickstoffgewinn von 1 bis 2 *mg* erzielte. Kaserer (21) berichtet über einen von ihm in Erde gefundenen Bazillus, *Bacillus azotofluorescens,* welcher die Gabe besitzen soll, nicht nur Ammoncarbonat in Ameisensäure und Stickstoff zu überführen, sondern welcher umgekehrt auch unter Benutzung von

73*

Ameisensäure oder Zucker als Näherstoffquelle Stickstoff zu binden vermag. Kaserer (21) stellt auch in einer neuen Arbeit die Beschreibung von Organismen in Aussicht, welche elementaren Stickstoff direkt zu nitrifizieren vermögen. Löhnis und Pillai (22) haben im Vorjahre wieder eine größere Anzahl von Organismen auf Stickstoffbindung geprüft. Als ganz hervorragend stickstoffbindend erwiesen sich mehrere Stämme von *Bacterium pneumoniae* (aerogenes), eine untersuchte *Torula* zeigte nur sehr schwache Stickstoffbindung, der Fungus imperfectus *Dematium pullulans* eine etwas stärkere. Volpino (23) beschreibt einen neuen mit keiner bisher gefundenen Art identischen Spaltpilz, welcher in der von ihm untersuchten Erde stark verbreitet war; derselbe soll neben Stickstoff auch Kohlensäure zu assimilieren vermögen, da er auf Nährplatten zur Vermehrung gebracht werden konnte, die nur aus Kieselsäureanhydrit bestanden, dem Spuren von Kohlehydraten zugefügt wurden. Jacobitz (24) behauptet, Stickstoffassimilation bei dem *Bacillus ellenbachensis, Alinit bacillus,* gefunden zu haben, welcher mit dem *Bacillus megatherium,* beziehungsweise dem *Bacillus subtilis* identifiziert wurde. Nach den Ansichten von Hiltner, Kolkwitz, Hartlieb und Heinze ist aber dieser Organismus weder mit *Bacillus megatherium* noch mit *Bacillus subtilis* identisch, sondern eine eigene Art aus der Subtilis-Gruppe. Dieser assimiliert nach Jacobitz nur sehr wenig Stickstoff. Keutner und Benecke (25) stellten weiter fest, daß auch im Meerwasser *Clostridium pastorianum* und *Azotobacter* vorkommen, und daß diese mit den in Erde lebenden Formen völlig identisch sind. Außer diesen beiden Arten fanden sie auch eine sehr große *Clostridium*-Art, *Clostridium giganteum* genannt, von welcher sie aber noch nicht den exakten Beweis erbringen konnten, daß sie zu den stickstoffprototrophen Organismen gehört. Keutner (26) fand, daß diese Organismen am Meeresgrund an festsitzenden Algen und auf Plankton-Organismen vorkommen. Keding (27) bestätigt diesen Befund, auch er fand sie auf verschiedenen Algen des Meeres.

Pringsheim (28) hat vor zwei Jahren ein vom *Clostridium pastorianum* abweichendes *Clostridium, Clostridium americanum,* beschrieben, welches, wie der Name sagt, aus Amerika

stammt. Dasselbe gehört in die von Graßberger und Schattenfroh aufgestellte Gruppe des *Granulobacter mobilis non liquefaciens*. Ferner beschreibt Pringsheim (29) in diesem Jahre drei weitere Clostridien, welche sich gleich dem *Clostridium americanum* durch kräftige Stickstoffassimilation auszeichnen. Die erste Art stammt von europäischen Lupinen, die zweite von Datteln, also ein subtropischer Bewohner, die dritte aus einer Erde, welche den hohen Regionen der Dolomiten entnommen wurde; er verwendete als Kulturmethode hierzu das Beimpfen steriler in Wasser untergetauchter Kartoffelstücke mit Erde, beziehungsweise mit Samen und konnte auch diese Arten durch langsamen Entzug von gebundenem Stickstoff an die Assimilation von Luftstickstoff gewöhnen. Haselhoff und Bredemann (30*a*) fanden sogar 7 neue Clostridien, die sie als α, β, γ, δ, ε, ζ, η unterschieden, teils in Erde, teils auf trockenen und frischen Blättern, teils auf verdorbenen Konserven. Bredemann (30*b*) hat in einer neueren Arbeit auch darauf hingewiesen, daß *Bacillus asterosporus* zu den Stickstoffsammlern gehöre, früher hatte er bereits den *Bacillus amylobacter* als stickstoffbindend erkannt. Das Verhältnis von verbrauchtem Zucker zur Stickstoffanreicherung betrug 1 *g* Zucker (Glucose) zu 1·16 bis 3 *mg* N. — In welcher Weise alle diese genannten und erwähnten Bakteriaceen den atmosphärischen Stickstoff binden und assimilieren, welche Produkte und Verbindungen da entstehen, bedarf derzeit noch sehr der Aufhellung, obwohl in der letzten Zeit mancher Ansatz hierzu gemacht wurde. So viel entspricht der allgemeinen Annahme, daß der Stickstoff als Nährstoff anzusprechen ist, welcher allmählich durch Synthese in das Eiweiß dieser Bakterienarten überführt wird. Über die Zwischenprodukte, welche hierbei entstehen, sind die Ansichten geteilt. — Da *Clostridium pastorianum* unter seinen Stoffwechselprodukten auch Wasserstoff erzeugt, hat Winogradsky bestimmt, anzunehmen, daß der gebildete Wasserstoff im Status nascendi sich im Plasma des Clostridiums zuerst mit dem freien Stickstoff zu Ammoniak verbinde. Der gleichen Ansicht ist Reinke (31). Gerlach und Vogel (32) glauben wieder, unter Hinweis auf die neuerer Zeit beobachteten synthetischen Bildungen von amidartigen

Körpern, daß der in den Stoffwechsel gerissene elementare Stickstoff an organische Kohlenstoffverbindungen angelagert und auf diese Weise das Körpereiweiß gebildet wird. Gautier und Drouin (33) sind andrerseits der Meinung, daß die fraglichen Mikroorganismen den Stickstoff unter vorhergehender Oxydation binden. Löw (34) stützt eine ähnliche Ansicht auf die Beobachtung, daß Platinmohr in Berührung mit Luft Spuren von Ammoniumnitrit bildet.

Wie aus vielfachen Beobachtungen hervorgeht, ist die Stickstoffbindung vieler der genannten Bakterienarten an der Oberfläche fester Nährsubstrate eine weitaus größere als in Flüssigkeiten. Werden *Azotobacter*-Kulturen auf Gipsplatten gezüchtet, so schnellt die Stickstoffbindung nach Freudenreich gewaltig hinauf, so daß eine Stickstoffzunahme bis zu 150 *mg* beobachtet werden kann. Bei dieser Versuchsanstellung können die Bakterien eben in idealer Weise, frei der Luft ausgesetzt, die Stickstoffbindung zur Durchführung bringen. Nach Schneider (35) ist auch die Stickstoffassimilation im Boden um so höher, je besser die Luft in denselben eindringen kann. Auch der Kalkgehalt ist von maßgebendem Einfluß, so begünstigt genügender Kalkgehalt im Boden die Stickstoffassimilation namentlich in der Form des kohlensauren Kalkes, besonders unter Zusatz von Kaliphosphat KH_2PO_4, wie Wilfarth und Wimmer (36) betonen. Auch Fischer (37) fand, daß in gekalkten Böden die Stickstoffassimilation durch *Azotobacter* eine höhere ist. Diese Beobachtung wurde neuerer Zeit von Krzemieniewski (38), Severin und Helene bestätigt, dagegen führt Remy (39) den Kalkstickstoff für *Azotobacter* in größeren Gaben als ungünstig an. Krzemieniewski weist neuster Zeit auch auf die Wichtigkeit der Ernährung des *Azotobacter* durch Kali hin. Koch (40), Litzendorf, Krall und Alves haben mit Erfolg die Tätigkeit der stickstoffassimilierenden Bodenbakterien durch Zufuhr von Kohlehydraten, z. B. Glucose, Rohrzucker, lösliche Stärke zu steigern versucht, andrerseits aber gefunden, daß Melasse eine N-Verminderung im Boden herbeiführt, eine Beobachtung, die von Stocklasa jedoch nicht geteilt wird. Krainsky (41) lenkt die Aufmerksamkeit auf die Feuchtigkeitsverhältnisse des

Bodens. Er fand, daß geringere Mengen von Feuchtigkeit im Boden die Stickstoffbindung begünstigen, größere Mengen sie verzögern. Sehr eingehend beschäftigt sich neuerer Zeit Stocklasa (42) mit der Ernährungsphysiologie der oligonitrophilen Bakteriaceen und der Untersuchung ihrer Stoffwechselprodukte. Als Abbauprodukte des als Kohlenstoffnahrung gebotenen Mannits fand er bei *Azotobacter chroococcum* Alkohol, Milchsäure, Essigsäure, in einem Falle auch Buttersäure, während Bernsteinsäure und Ameisensäure fehlten. Wurde Glucose als Nahrung geboten, so verlief der Abbau ähnlich, nur bildet sich in diesem Falle auch Ameisensäure. An Gasen traten ausschließlich Kohlensäure und Wasserstoff auf. Stocklasa schreibt den Abbau von Mannit und Glucose der Wirkung glycolitischer Enzyme zu und glaubt, daß die Bildung von Wasserstoff eine wichtige Rolle bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes spielt. Die Mitteilung Stocklasa's, daß bei der Zersetzung der Kohlehydrate Wasserstoff, Alkohol und Kohlensäure entstehen, wird übrigens neuester Zeit durch Krzewieniewski (43) in Zweifel gezogen. In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit hat Stocklasa (44) seine Versuche wiederholt und gefunden, daß bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch Reinkulturen von *Azotobacter chroococcum* Wasserstoff in erheblichen Mengen entsteht und daß dieser Wasserstoff eine ganz bestimmte Aufgabe bei der Bindung elementaren Stickstoffes zu erfüllen habe. Es dürfte nach Ansicht des Verfassers als erstes Produkt CNH entstehen, welches sodann die Grundlage der Eiweißsynthese bei den weiteren Stoffwechselprozessen abgibt. Stocklasa hat den *Azotobacter chroococcum* einer eingehenden Analyse unterzogen und in der Reinasche desselben unter anderem verhältnismäßig sehr viel Phosphorsäure und Kaliumoxyd gefunden. In diesen beiden Stoffen sieht er quasi Coenzyme der glycolitischen Enzyme, da sie dieselben bei der Zersetzung von Kohlehydraten wesentlich unterstützen. Nebst den beiden genannten Substanzen schreibt er auch dem für den Atmungsprozeß so wichtigen Mangan eine besondere Wirkung bei der Stickstoffassimilation zu. Stocklasa konnte aus *Azotobacter*-Kulturen Enzyme isolieren, welche der Zymase und Lactacidase sehr ähnlich sind.

Mit diesen und anderen Enzymen wie den Schizasen vermag *Azotobacter* die zahlreichen Kohlehydrate, die sich in der Erde namentlich in der Form der Furfuroide vorfinden und von welchen die Pentosane die wichtigsten sind, allmählich abzubauen, in Monosaccharide wie Arabinose und Xylose zu verwandeln und diese dann weiter zu spalten.

Außer bei freilebenden Spaltpilzen wird Stickstoffprototrophie zunächst auch für einige Vertreter aus dem Stamme der *Euthalophyta* behauptet, jedoch herrscht hierüber noch keine Einigkeit. Berthelot (45) gibt Stickstoffixierung für *Aspergillus niger, Alternaria tenuis* und *Gymnoascus* an, jedoch soll nur die *Alternaria*-Kultur rein gewesen sein. Winogradsky fand bei *Aspergillus* keine Stickstoffbindung, Puriewitsch (46) jedoch schreibt dem *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* diese Eigenschaft zu. Saida (47) fand, daß *Aspergillus niger, Mucor stolonifer, Endococcus purpurascens* und *Phoma betae* freien Stickstoff assimilieren. Nachprüfungen dieser Arbeit durch Koch (48) haben aber negative Resultate ergeben, jedoch meint dieser, daß hieraus noch nicht ohne weiteres gefolgert werden darf, daß die Angaben von Puriewitsch und Saida unrichtig sind, da es ja auch bei älteren Reinkulturen von *Azotobacter* vorkommt, daß sie nur eine außerordentlich schwache, hie und da auch gar keine Stickstoffbindung zeigen. Nach der Ansicht Heinze's (49) sind höhere Pilze nicht imstande, den freien Stickstoff der Luft zu binden. Wenn sie trotzdem für die im Boden vor sich gehende Stickstoffsammlung von Bedeutung sind, so beruht dies darauf, daß sie ähnlich wie die Algen für die eigentlich stickstoffsammelnden Bakterien den Kohlenstoff in möglichst geeigneter Form zu liefern vermögen.

Ternetz (50) überprüfte neuester Zeit gleichfalls *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum*, fand aber, daß diesen Pilzen die Stickstoffbindung nur in sehr geringem Grade innewohnt. Im vergangenen Jahre hat Fröhlich (51) mehrere Schimmelpilze, wie *Alternaria tenuis, Macrosporium commune, Hormodendron cladosporioides* und *Cladosporium herbarum* auf Stickstoffbindung überprüft und angeblich gefunden, daß

die durch diese Pilze assimilierte Stickstoffmenge größer ist als bei *Clostridium pasteurianum.*.

Was die Stickstoffbindung durch Algen anbelangt, so wurden eingangs bereits die Anhäufungsversuche Beijerinck's mit *Cyanophyceen* erwähnt.

Frank (52) einerseits, Schlösing und Laurent (53) andrerseits schlossen aus der Vermehrung verschiedener Algen in sterilem und von der Sonne beschienenem Sand auf ihr Vermögen, N zu binden. Sie fanden bei der Bestimmung des Stickstoffgehaltes in diesen Sandkulturen eine starke Stickstoffanreicherung. Kossowitsch (54) hat später diese Versuche nachgeprüft, aber speziell bei Reinkulturen von *Cystococcus* ein negatives Resultat erhalten. Er fand aber starke Stickstoffixierung, wenn er die Algen mit Bodenbakteriengemischen kultivierte, und neigt zu der Ansicht hin, daß Algen allein zwar nicht imstande sind, Stickstoff zu binden, wohl aber in einer Art symbiotischen Verhältnisses mit Bodenbakterien den durch diese Organismen assimilierten Stickstoff weiter verwenden und dafür diesen die Lieferung von Kohlehydraten vermitteln. Eine Bestätigung hierzu lieferte auch Hugo Fischer (55), welcher ein symbiotisches Verhältnis des *Azotobacter* nicht allein mit Meeresalgen, sondern auch mit bodenbewohnenden *Oscillatorien* beobachtete. Auch Heinze (56) spricht den Algen im Boden insoweit eine große Bedeutung zu, als sie stickstoffsammelnde Organismen, namentlich *Azotobacter* in reichlichem Maße mit wertvollen besonders geeigneten Kohlenstoffverbindungen wie Mannit, Glycogen eventuell auch mit Pentosanen (Pentosen) versorgen und ihnen die Energie liefern, kräftigst Stickstoff zu assimilieren. Es ist dies zugleich die verbreitetste Ansicht, daß Algen, wie gesagt, nicht direkt stickstoffbindend wirken, sondern die stickstoffbindenden Spaltpilze durch Überlassung von Nährstoffen unterstützen. Auch Krüger und Schneidewind (57) konnten mit Reinkulturen von *Stichococcus, Chlorella* und *Chlorothecium* keine Stickstoffbindung erhalten. Wäre die Ansicht von Benecke und Keutner (58) richtig, daß die von Beijerinck entdeckten *Azotobacter*-Arten nicht Bakterien sind, sondern zu den farblosen Algen gehören und als farblose *Aphanocapsa*-Arten

aufzufassen sind, so wären auch vereinzelte Algen einwandfrei als stickstoffprototrophe Organismen anzusprechen. Auch für weitaus höher stehende Pflanzen als Algen wird Stickstoffassimilation behauptet. Hier muß zuerst der Ansicht Frank's gedacht werden, daß jedes pflanzliche Protoplasma freien Stickstoff zu assimilieren vermag, daß jede Pflanze mehr oder weniger den freien Luftstickstoff in ihren Stoffwechsel einbeziehen kann. Scheinbar bestätigt wurde diese Annahme für Hafer und Senf durch Liebscher (59), für Gerste durch Petermann (60), für Hafer und Roggen durch Atwater und Woods (61). Zahlreiche andere, und zwar neuere Arbeiten haben aber gezeigt, daß der höheren Pflanzenwelt keine Stickstoffbindung innewohnt. Bisher sind aber alle Untersuchungen mit sehr geringen Ausnahmen in nicht oder nur unvollständig sterilisierter Erde oder sonstigen unsterilen Nährböden angestellt worden, so daß über die Stickstoffprototrophie höherer Pflanzen noch keine Klarheit herrscht. Nur Petermann (62) hat später bei seinen Versuchen mit Gramineen vollständig sterile Nährböden benützt und konstatiert, daß diese Gewächse keinen Stickstoff binden, während Stocklasa (63) das Gegenteil beobachtet haben will. Neuerer Zeit vertritt auch Jamieson (64) den Standpunkt, daß die Pflanzen ganz allgemein freien Stickstoff direkt aus der Luft aufnehmen und in Eiweiß verwandeln. Nach seiner Theorie sind speziell die Blätter der Pflanzen zur Stickstoffassimilation befähigt, aber nur dann, wenn ihre Epidermis außerordentlich dünn ist. Als ganz besondere Konzentrationszentren der Stickstoffassimilation sieht Jamieson gewisse spezifisch ausgebildete Haare der Blätter, Blattstiele und Stengel an. Durch Anwendung verschiedener Eiweißreagentien wie Jod, Kupfersulfat, Millon's Reagens gelang es ihm angeblich nachzuweisen, daß die Albumingeneratoren, wie er diese Haare nennt, in ihren Scheitelzellen Eiweiß in großen Mengen produzieren, dessen Stickstoff nur der Luft entstammen könne. Er fand, daß diese Scheitelzellen sich zuerst mit Eiweiß anreichern, während alle übrigen Zellen des Haares erst von hier aus mit Eiweiß in größerer Menge versorgt wurden.

Die Untersuchungen Jamieson's sind, zwar nur qualitativ durchgeführt, an sich sehr interessant, doch stehen sie mit allen bisherigen Erfahrungen in dieser Frage so sehr in Widerspruch, daß sie nicht plausibel erscheinen und auch theoretisch schwer verständlich sind.

Ich habe bisher nur auf die Stickstoffassimilation durch frei in der Erde lebende Organismen Rücksicht genommen. Es erübrigt noch, kurz auf die Bindung freien Stickstoffes durch das Zusammenwirken von Schizomyceten und Eumyceten mit höheren Pflanzen einzugehen. Hier will ich mich, da meinem Thema fernerliegend, nur auf die wichtigsten Tatsachen beschränken. Schon in den Werken einiger landwirtschaftlicher Schrifsteller des Altertums, wie des Plinius und Varrus, war die Meinung ausgesprochen worden, daß man den Boden nach Ernten von Leguminosen nicht zu düngen brauche. Man bezeichnete diese Pflanzengruppe als Boden bereichernd, während man die Gramineen als bodenzehrend bezeichnete. Später fanden Lawes und Gilbert, daß die bodenbereichernde Fähigkeit auf eine Stickstoffwirkung zurückzuführen ist und man nannte die Leguminosen Stickstoffmehrer zum Unterschied von den Halmfrüchten, Hackfrüchten etc., welche mit dem Namen Stickstoffzehrer bezeichnet wurden. Die ersteren reicherten, wie man sah, den Stickstoffgehalt im Boden an, die letzteren entnahmen und erschöpften denselben bei fortdauerndem Anbau.

Liebig war es zuerst, der aus diesen Tatsachen die Ansicht schöpfte, daß der Luftstickstoff in irgendeiner Weise zur Ernährung der Leguminosen herangezogen werde. Die Versuche, welche Boussingault (65) und auch andere anstellten, brachten in diese Frage noch keine Entscheidung. Erst im Jahre 1886 brachten die Arbeiten von Hellriegel und Wilfarth (66) den sicheren Nachweis, daß die Leguminosen durch den Besitz der schon lange, speziell schon Malpighi (67) bekannten knöllchenartigen Anschwellungen an den Wurzeln befähigt sind, den Stickstoff der Luft zu assimilieren. Woronin (68) andrerseits kommt das Verdienst zu, zuerst, und zwar bereits im Jahre 1866 darauf hingewiesen zu haben, daß diese Knöllchen von lebenden, den Bakterien ähnlichen Gebilden erfüllt sind. Es dauerte ziemlich lange, und zwar bis zum Jahre 1888,

als es Beijerinck (69) gelang, die Natur dieser Lebewesen festzustellen. Er vermochte, sie auf künstlichen Nährböden zu züchten, indem er einen Absud von Papilionaceenblättern anfertigte, dem 7 % Gelatine, $^1/_4$ % Asparagin und $^1/_2$ % Rohrzucker zugesetzt wurden. Auf diesem Nährboden treten die Knöllchenbakterien in zwei Zellgestalten auf, als Stäbchen von 4 bis 5 μ Länge, 1 μ Breite und als sogenannte Schwärmer von 0·9 μ Länge und 0·18 μ Breite; die ersteren dürften nach neuerer Ansicht bereits die Involutionsform, die Bakteroidenform darstellen, während die Schwärmer die typischen Formen der Leguminosenbakterien bilden, da die jugendlichsten Individuen in den Knöllchen selbst dieselbe Größe und Form besitzen. Beide Zellformen sind beweglich und unfähig, Sporen zu bilden; infolgedessen ist es sehr richtig, daß Prażmowski die von Beijerinck zuerst gewählte Bezeichnung *Bacillus radicicola* in *Bacterium radicicola* veränderte.

Frank (70) bezeichnete diese Bakterienart ganz überflüssigerweise mit *Rhizobium leguminosarum,* eine Benennung, die jetzt glücklicherweise immer mehr aus der Literatur verschwindet. Beijerinck unterschied die Knöllchenbakterien in zwei Gruppen. Bei der ersten Gruppe sind die Kolonien auf Leguminosengelatine mehr hyalin. Das Wachstum ist auf Fleischwassergelatine schwierig oder bleibt überhaupt aus, wird aber durch Rohrzucker und Glucose gefördert. Die Schwärmer sind sehr klein. Die Bakteroiden sind zweiarmig oder kugelig oder birnförmig. In dieser Gruppe unterscheidet Beijerinck verschiedene Variationen, nämlich *Bacterium radicicola* var. *Fabae,* var. *Viciae hirsutae,* var. *Trifoliarum,* var. *Pisi,* var. *Lathyri.* An diese dürften sich die *Medicago-, Genista-* und *Melilotus*-Bazillen anschließen. Bei der zweiten Gruppe sind die Kolonien mehr trüblich weiß und opak. Das Wachstum auf Fleischwassergelatine ist etwas kräftiger als bei der ersten Gruppe. Die Schwärmer sind stäbchenförmig und etwas länger als bei der ersten. Die Bakteroiden sind weniger verzweigt. Die durch diese Bakterien verursachten Knöllchen lassen sich in drei Typen unterscheiden: in den *Phaseolus, Lupinus-* und *Robinia*-Typus. Nobbe, Schmid, Hiltner und Hotter (71) beschäftigten sich dann später sehr intensiv mit

der näheren Beschreibung und Unterscheidung der einzelnen Leguminosenbakterien. Sie stellten zunächst fest, daß nur geringe morphologische Unterschiede bei den einzelnen Arten vorkommen, ferner fanden sie, daß die aus einer Leguminosenart isolierten Bakterien sehr kräftige Knöllchenbildung bei dieser Art wieder hervorzurufen vermögen, daß aber die Knöllchenbildung bei anderen Leguminosenarten in der Regel eine schwächere wird, je weiter diese von den ersteren im botanischen Systeme abstehen. Doch sind hier wieder Unterschiede zu machen; die Knöllchenbakterien der *Pisum-* und *Vicia*-Arten stehen einander näher, sie können einander leichter vertreten, hingegen zeigen die *Trifolieen*-Arten größere Unterschiede. So beobachteten Nobbe und Hiltner (71) bei *Medicago sativa* ein völliges Ausbleiben der Knöllchenbildung, wenn in dem sterilisierten Gemisch von Sand und Erde, welches zur Nahrung diente, Bakterien aus *Trifolium pratense* ausgesäet wurden. Noch auffallender sind die Unterschiede zwischen den Knöllchenbakterien der einzelnen *Lupinus*-Arten, ähnlich verhält es sich auch bei *Robinia*, hingegen kann die Gattung *Phaseolus* sehr leicht durch Bakterien aus Knöllchen anderer Leguminosen infiziert werden, so durch *Pisum-*, *Robinia*-Bakterien. Umgekehrt haben die *Phaseolus*-Bakterien stets Knöllchen bei *Pisum* hervorgebracht, die unter gewissen Umständen jedoch nur eine geringe Wirkung auf das allgemeine Wachstum der Pflanzen hervorbrachten, dagegen gelang es nicht, *Robinia* durch *Phaseolus*-Bakterien zur Knöllchenbildung zu bringen. Aus allen genannten Versuchen schlossen Nobbe und Hiltner (72), daß die Leguminosenbakterien nur Anpassungsformen einer Art seien. Eine große Unterstützung erfuhr diese Annahme, daß *Pisum*-Bakterien und *Phaseolus*-Bakterien ineinander überführt werden können. Kirchner (73) fand später, daß die *Soja*-Bohne eigener Bakterien bedürfe, um sie zur Knöllchenbildung zu bringen, doch erwiesen es Hiltner und Störmer (74) als sehr wahrscheinlich, daß *Lupinen*-Bakterien durch Anpassung in *Soja*-Bakterien überführt werden können. Mazé (75) legte bei seiner Einteilung der Leguminosenbakterien im Gegensatz zu Beijerinck nicht morphologische sondern physiologische Unterschiede zugrunde. Er unter-

schied sie in zwei Gruppen, in eine Gruppe, die in sauren Böden, und in eine zweite Gruppe, die in basischen Böden vorkommt. Hiltner (76) erwies aber die Unhaltbarkeit dieser Auffassung.

Im Jahre 1903 haben Hiltner und Störmer (77) die Frage der Arteinheit der Knöllchenbakterien neuerdings studiert und festgestellt, daß dieselben sich in zwei ziemlich scharf zu trennende Gruppen unterscheiden lassen, und zwar nicht allein in morphologischer sondern auch in physiologischer Beziehung. Diese zwei Gruppen wurden als zwei verschiedene Arten aufgestellt und die eine Art mit *Rhizobium radicicola,* die andere mit *Rhizobium Beijerinckii* (H. und St.) bezeichnet. Der wesentliche Unterschied in physiologischer Beziehung beruht darauf, daß *Rhizobium Beijerinckii* gar nicht oder nur sehr schwer auf gelatinösen Nährböden zum Wachsen zu bringen ist. Zu dieser Art, die nur auf Agar gedeiht, gehören die Erreger der Wurzelknöllchen von *Lupinen, Seradella,* welche beide nach Gerlach und Vogel (78) sich völlig gegenseitig vertreten können, und *Soja,* während die auf Gelatine wachsende Art alle übrigen Knöllchenbakterien umfassen soll. Nach Ansicht der Verfasser besteht jede Art aus verschiedenen Varietäten, sogenannten Standortsvarietäten, die durch Anpassung ineinander überführbar sind. Anhangsweise hiezu sei erwähnt, daß Rodella (79) aus den Knöllchen der Leguminosen regelmäßig die Entwicklung einer anaeroben Bakterienart beobachtete, welche er mit Winogradsky's *Clostridium pastorianum* zu identifizieren glaubte, aber von dieser Ansicht durch weitere Spezialuntersuchungen wieder abgekommen ist, da diese Art sowohl auf Nährgelatine wie auf gezuckertem Agar sehr gut fortkommt, was bei dem eigentlichen *Clostridium pastorianum* nur in geringerem Maße der Fall ist. Gino de Rossi (80) führt in einer sehr umfangreichen Arbeit aus, daß das *Bacterium radicicola Beijerinckii* noch sehr unsicher und wenig genau beschrieben wurde. Der von ihm entdeckte Stamm sei der erste, der in völlig einwandfreier Weise reingezüchtet und sicher individualisierend identifiziert wurde. Da man erkannt hatte, daß die Knöllchen der Leguminosen eine so überaus wichtige Bedeutung für die Stickstoffversorgung der

Leguminosen haben, ging man dann später auch an die Untersuchung der physiologischen Bedeutung der knöllchenartigen Anschwellungen anderer Pflanzen. Schon lange waren solche Anschwellungen bei den Erlen und Ölweiden bekannt. Brunchorst (81) fand sie weiter bei *Myrica Gale,* Beijerinck (82) bei *Melampyrum pratense* und *Rhinanthus major.* Hiltner (83) konnte Knöllchenbildung auch bei *Scrophulariaceen* und *Labiaten* nachweisen. Woronin (84) fand in den Knöllchen der Erlen einen Pilz, welchen er *Schinzia alni* nannte. Später haben sich mit diesem Organismus besonders Möller (85), Brunchorst (86) und Frank (87) beschäftigt.

Brunchorst konnte diesem Organismus im System der Pilze keinen Platz anweisen, obwohl er ähnlich wie *Mucoraceen* Sporangien bildet. Er nannte ihn *Frankia subtilis.* Frank hält *Frankia subtilis* nicht für einen Pilz, sondern »nur für etwas von pilzlicher Abkunft, für ein im Stoffwechsel einer anderen Pflanze degeneriertes, gewissermaßen zum Bestandteil der letzteren gewordenes und zugrunde gegangenes Lebewesen«.

Nach Hiltner's (88) Ansicht ist *Frankia subtilis* ein bakterienartiger Organismus, dessen fadenartige Coenobien leicht in stäbchenartige Glieder zerfallen. Shibata (89) schließt sich im großen und ganzen dieser Ansicht an. Bjorkenheim (90*a*) und Zach (90*b*) beobachteten in Weißerlenknöllchen einen Hyphenpilz von auffallend großen Dimensionen, ohne sich aber über die systematische Stellung desselben zu äußern. Die Stickstoffassimilation durch die Knöllchen der Erlen ist nach Hiltner eine recht hohe.

Auch für *Elaeagnus angustifolius*, die Ölweide, haben Nobbe und Hiltner den Nachweis erbracht, daß diese Pflanzenart durch den Besitz der Knöllchen nicht auf den Bodenstickstoff angewiesen ist. Der die *Elaeagnus*-Knöllchen erzeugende Organismus ist wie Brunchorst nachwies, dem der Erlen sehr ähnlich. In den Knöllchen von *Myrica Gale* lebt nach Shibata eine *Actynomyces*-Art. Auch in *Cycadeen* kommen Knöllchen vor, in welchen eine Alge, wahrscheinlich eine Art *Nostoc* oder *Anabaena* gefunden wurde. Brunchorst (91) hält

aber den Erreger nicht für eine Alge, sondern für einen nicht weiter benannten Pilz. Nach Ansicht von Hiltner dürfte es aber keinem Zweifel unterliegen, daß in den Knöllchen der *Cycadeen* vorzüglich Algen anzutreffen sind. Schneider hat übrigens auch mehrere Bakterienarten in den Knöllchen der *Cycadeen* gefunden. Schließlich wäre auch noch der Mykorrhizen Erwähnung zu tun, da auch diese Bildungen teilweise mit der Stickstofffrage in Verbindung stehen. Zuerst beschäftigte sich Wahrlich (92), und zwar genauer mit der *Mykorrhiza*-Bildung an *Orchideen*-Wurzeln, obschon vorher Reeß (93) eine Verpilzung an Koniferenwurzeln durch *Elaphomyces,* ein Jahr später (1881) Kamiénski (94) an der chlorophyllosen Pflanze *Monotropa hypopitys* beobachtete. Frank (95) war es dann, welcher allgemein auf die Verpilzung der Wurzeln verschiedener Pflanzen aufmerksam machte. Er unterschied ectotrophe Mykorrhizen, bei welchen der Pilz mantelähnlich die Wurzeln von außen umgibt und nur in die peripheren Teile derselben eindringt und endotrophe Mykorrhizen, bei welchen sich die Pilzfäden mehr im Innern und an bestimmten Stellen entwickeln.

Ectotrophe Mykorrhizen finden sich nach Frank fast bei allen *Coniferen* und *Cupuliferen*, endotrophe bei *Orchideen, Ericaceen* und anderen. Ergänzt wurde diese Mitteilung durch eine Arbeit Tubeufs (96), welcher auch bei verschiedenen Coniferen die Bildung von endotrophen Mykorrhizen beobachtete. Schlicht (97), Janse (98) und namentlich Stahl (99) haben dann die Kenntnisse der Mykorrhizen erweitert; letzterer führte aus, daß die Mykorrhizenbildung nur bei submersen und schwimmenden Wasserpflanzen und einzelnen artenreichen Familien *(Cyperaceen, Cruciferen, Polypodiaceen)* fehle, während sie bei der Mehrzahl der höheren Pflanzen entweder fast stets oder doch vorübergehend aufzutreten pflegt. Ectotrophe Mykorrhizen scheinen von verschiedenen Pflanzen hervorgebracht zu werden, während an der Bildung der endotrophen nur eine Pilzart beteiligt zu sein scheint.

Die Bedeutung der ectotrophen Mykorrhizen für das Leben der Pflanzen konnte bisher noch nicht einwandfrei erklärt werden, die endotrophe Mykorrhizenbildung steht aber gewiß mit der Stickstoffassimilation in Zusammenhang; es

dürfte in hohem Grade wahrscheinlich sein, daß durch diese Bildung eine Bindung des freien atmosphärischen Stickstoffes erfolgt, wie speziell die Arbeiten von Nobbe und Hiltner (100) einerseits, von P. E. Müller (101) andrerseits dartun, obwohl neuester Zeit sich Möller (102) gegen Müller wendet, indem einzelne endotrophe Mykorrhizen, wie die der Bergkiefer, absolut keinen Stickstoff binden. Hiltner hat neuerer Zeit auch noch darauf hingewiesen, daß möglicherweise durch Pilzmycelien, welche hie und da auch auf oberirdischen Pflanzenteilen vorkommen, eine Stickstoffassimilation herbeigeführt werden kann; so fand Hiltner einen Pilz auf dem Taumellolch, welcher auf die Wirtpflanze eine fördernde Wirkung äußerte, welche Beobachtung von Nestler (103), der von einer echten Symbiose spricht, bestätigt wurde. Neuester Zeit hat Ternetz (104) auf *Ericaceen* fünf Arten von *Phoma*-Pilzen beobachtet und experimentell festgestellt, daß dieselben zur Stickstoffbindung deutlich befähigt sind.

Wie aus vorliegender Übersicht, in die ich nur das Wichtigste über das Vorkommen bisher gefundener oligonitrophiler Organismen aufgenommen habe, hervorgeht, ist bisher ein Blastomycet oder Sproßpilz im weiteren Sinne mit Ausschluß der von Löhnis untersuchten *Torula* noch nicht als stickstoffprototroph angesprochen worden. Ich erinnere mich zwar, vor Jahren an irgendeiner Stelle gelesen zu haben, daß *Blastoderma salmonicolor* den atmosphärischen Stickstoff zu binden vermag, doch erscheint diese Beobachtung in keiner der neueren Arbeiten und Zusammenfassungen *oligonitrophiler* Organismen aufgenommen, so daß ich hier nur kurz hierauf verweisen will. Der von mir, wie schon eingangs erwähnt, auf Lorbeerblättern gefundene Pilz dürfte, wie meine Ausführungen ersichtlich machen werden, zu den mittelstarken stickstoffassimilierenden Organismen gehören. Dieser Pilz, welchen ich, wie ich hier gleich mitteilen will, infolge gänzlichen Ausbleibens von Ascusbildung zu den Fungi imperfecti rechnen muß, bringt unter keinen Umständen ein typisches Mycel zur Entwicklung, sondern wächst auf allen Nährböden und unter allen Verhältnissen in Sproßmycelien oder durch Knospung.

Er muß daher zu den *Blastomyceten* oder Sproßpilzen im weiteren Sinne gerechnet werden. Derselbe fand sich in ziemlicher Menge auf den untersuchten Lorbeerblättern vor. In dem einen Falle bildete er bis zu 18% sämtlicher auf Zuckeragar aufgegangenen Keime.

Die Blätter wurden zur Eruierung ihres Keimgehaltes einzeln in kleine je 20 cm^3. Wasser enthaltende Pulvergläser gebracht, hier gründlich durch Schütteln abgespült und eine äquivalente Menge der Aufschlemmflüssigkeit zur Anlage einer Plattenkultur auf Zuckeragar verwendet. Zur Darstellung dieses Zuckeragars diente nach Beijerinck's Vorschrift eine 2% Agargallerte, in welcher durch oftmaliges Waschen mit Wasser der Stickstoffgehalt auf ein Minimum herabgedrückt wurde. In der hinterbliebenen Masse wurden dann pro 100 *g* 2 *g* d-Glucose chem. pur Merck und 0·02 *g* saures phosphorsaures Kali gelöst. Die verwendete Glucose erwies sich, nach der Lassaigne'schen Probe überprüft, als nahezu stickstofffrei, jedesfalls ergab sie keine Reaktion, welche mehr als Spuren von Stickstoffsubstanzen angedeutet hätte. Es enthielt daher der benützte Glucoseagar nur die außerordentlich geringen Stickstoffanteile, welche das Wiener Hochquellenwasser besitzt, sowie die geringen Mengen von Stickstoffverbindungen des ausgewaschenen Agars. Bevor ich an die weitere Untersuchung dieses Sproßpilzes ging, um seine morphologischen und physiologischen Eigenschaften festzustellen, hielt ich es für notwendig, von demselben eine einwandfreie Reinzucht herzustellen. Hiebei begnügte ich mich nicht, den Organismus auf Zuckeragar auszusäen und dann aus einzelnen Kolonien Verdünnungen anzulegen, wie dies bei Bakterienreinzuchten üblich ist, sondern ich benützte die Einzellenzucht, ging also von einer einzelnen Zelle aus. Da der Organismus, seinen natürlichen ökologischen Verhältnissen entsprechend, auch künstlich herangezüchtet werden sollte, lag mir daran, nur Oberflächenkolonien zu erhalten. Ich stellte mir zu diesem Zweck auf größeren quadrierten Deckgläschen dünne Platten von dem beschriebenen Zuckeragar her, welcher zuvor einigemale filtriert wurde, bis er die entsprechende Pelluciditât besaß und es leicht war, die ausgesäten Keime zu

sehen und ihre weitere Entwicklung zu beobachten. Es wurde hierauf von dem Hefebelag einer jungen Zuckeragarkultur eine Aufschlemmung in sterilem Wasser angefertigt, die derart beschaffen war, daß ein kleines Mikrotröpfchen von zirka 1 bis $1^1/_2$ *mm* Durchmesser aus derselben zirka einen Keim enthielt. Solche Tröpfchen trug ich nun reihenweise mittels steriler Glaskapillaren in die Mitte der Quadrate auf und brachte die so adjustierten Deckgläschen unter allen Kautelen eines sterilen Arbeitens auf eine Böttcher'sche Kammer, die ja gewöhnlich zur Anlage von Hefereinkulturen benützt wird. Nun wurden die einzelnen Quadrate durchmustert und jene Quadrate speziell im Auge behalten, in welchen nur eine Hefezelle gesehen worden war. Da das Wasser aus der Hefeaufschlemmung rasch in den Agar aufgesaugt wird, kommen die Hefezellen bei dieser Kulturmethode auf der Oberfläche des Agars zu liegen und werden sich die Kolonien zu Oberflächenkolonien entwickeln. Nach 24 Stunden wurden die Platten einer neuerlichen Perlustration unterzogen und nun bei jeder Kolonie die Anzahl der gebildeten Tochterzellen festgestellt. Jene Kolonien wurden dann weiter beobachtet, welche die relativ meisten Zellen enthielten, denn diese mußten aus den wachstumskräftigsten und schnellwüchsigsten Zellen hervorgegangen sein. Von diesen Kolonien wurden nach entsprechender Zeit Strichkulturen auf Zuckeragar angelegt, welche dann für die weiteren Untersuchungen als Ausgangsmaterial dienten.

A. Verhalten des Pilzes auf verschiedenen Nährböden und seine morphologischen Eigenschaften.

a) **Würzegelatine.**

Auf diesem Nährboden entwickelt der Mikrobe ganz glattrandige Beläge; auch auf der Oberfläche der Kolonien, selbst der Riesenkolonien sind keine Differenzierungen bemerkbar, die Riesenkolonien ähneln sehr dem *Torula*-Typus. Die Einzelorganismen sind zumeist von elliptischer Gestalt und knospen fast stets polar. Sie besitzen eine Länge von 8 bis 12 μ, eine Breite von 3 bis 4 μ. In älteren Zellen treten stark lichtbrechende Vacuolen, zumeist in der 2 bis 3 Zahl auf (siehe Zuckeragar).

b) **Brot.**

Auch hier weist die Kultur ein ganz glattes Aussehen von grauweißer Farbe auf. Die Zellen sind zumeist elliptisch; hie und da kommen auch kugelige Zellen vor. Die Größendimensionen betragen 4 bis 7·5 μ Länge, 2·5 bis 3 μ Breite. In älteren Zellen kommt es zur Bildung von deutlich hervortretenden Vacuolen.

c) **Kartoffel.**

Die Kultur besitzt eine weiße Farbe, ist ganz glatt umrandet und stark über das Nährsubstrat emporgewölbt, überhaupt sehr kräftig entwickelt. Ältere Kartoffelkulturen zeigen an dem dünneren und trockeneren Ende der keilförmig geschnittenen Kartoffel ein kreidiges Aussehen. Hier sind die Zellen sehr unregelmäßig gestaltet und zur Involutionsformenbildung geneigt, so finden sich oft Zellen in Dreiecksform; manche Zellen sind von enormer Größe, andere wieder sehr klein. Am unteren feuchten Teil der Kartoffel besitzen die Zellen regelmäßigere Formen, doch sind sie mehr kurz und breit.

d) **Glucoseagar.**

Auf diesem Nährboden bildet der Organismus einen überaus kräftigen, fast weißen Belag, der sich stark über das Nährsubstrat erhebt und glattrandig gegen dasselbe abfällt. Von einer Differenzierung auf der Oberfläche ist kaum etwas zu sehen.

Die Zellform ist elliptisch, die Länge beträgt 5 bis 8 μ, die Breite 2·5 bis 3 μ. In älteren Kulturen erscheint auch auf diesem Nährboden das Protoplasma der Zellen stark differenziert, indem es zur Ausbildung stark lichtbrechender Vacuolen kommt. Ursprünglich hatte ich diese Gebilde bei flüchtiger Ansicht für Ascosporen gehalten, doch fehlt diesem Pilze die Eigenschaft, Ascosporen zu bilden, soweit ich wenigstens Einsicht nehmen konnte, vollständig, denn weder auf Gipsblöcken, Tonblöcken, noch auf Kartoffeln und gelber Rübe kam es trotz mehrwöchiger Kultivierung zur Ascusbildung. Die fraglichen Gebilde waren aber auch weder fettartiger Natur, noch bestanden sie aus Glycogen, da alle in dieser

Richtung angestellten Reaktionen ein negatives Resultat ergaben. Dagegen trat bei Behandlung mit Glycerin, 10% salpetersaurer Kalilösung, Zuckerlösung (Syrup. simpl.) sofort Plasmolyse ein, wobei die stark lichtbrechenden Inhaltskörper verschwanden. Dieselben stellen demnach Vacuolen mit stark lichtbrechendem Inhalt vor. Ich habe dann später eine ganze Reihe verschiedenprozentiger Zuckerlösungen zur Einwirkung gebracht und gefunden, daß erst eine 25 bis 30% Lösung plasmolysierend wirkt, woraus hervorgeht, daß der Inhalt der Vacuolen eine sehr hochprozentige Lösung darstellt. Diese Vacuolenbildung ist noch dadurch interessant, daß sie sich stets nach beendeter Vermehrung einstellt. Bringt man nämlich alte vacuolisierte Zellen auf neues Nährsubstrat, so beginnen die Zellen alsbald zu knospen, die Vacuolen verschwinden dann allmählich, der Zellinhalt wird mehr weniger hyalin und unterscheiden sich dann die Zellen nicht wesentlich von den Tochterzellen, deren Protoplasma noch gar keine Granulation aufweist. Die Knospung geht weiter, aus den Tochterzellen entstehen weitere Zellen, nach einigen Tagen hört aber die Bildung neuer Zellen auf, das Protoplasma fast aller Zellen zeigt die Tendenz zu granulieren, die scheinbaren Granula vergrößern sich und werden zu Vacuolen. Ich habe mir die Mühe genommen, diesen Gang der Entwicklung von Tag zu Tag zu beobachten.

Am 6. Jänner wurde die Kultur frisch abgeimpft, am 7., 8., 9. Jänner befanden sich alle Zellen in kräftiger Knospung, an diesem Tage war die Oberfläche des Agars völlig von den Zellen bedeckt, am 10. Jänner erschien das Protoplasma schon in vielen Zellen nicht mehr hyalin und gleichmäßig zusammengesetzt, sondern durch kleine Inhaltskörper granuliert, am 11. und 12. Jänner war fast keine Zelle mehr in Knospung begriffen, sämtliche Zellen zeigten die feine Granulierung, am 13. Jänner, also nach sieben Tagen begannen sich deutliche, stark lichtbrechende Vacuolen zu bilden. Die Zahl der Vacuolen ist hierbei in den einzelnen Zellen nicht gleich. Manche Zellen enthalten zwei bis drei größere, andere Zellen wieder mehrere kleinere Vacuolen, auch ergaben sich Unterschiede in der Größe der Vacuolen. In diesem Entwicklungszustand

halten die Zellen monatelang aus, ohne daß Vermehrung eintritt, ohne daß sie aber auch zugrunde gehen. Auf neues Nährsubstrat gebracht, beginnen dann nach einiger Zeit fast sämtliche Zellen wieder auszuknospen, es ist also kaum eine während der langen Ruheperiode zugrunde gegangen. Diese Vacuolenbildung scheint eine Art Dauerstadium vorzustellen, bei welchem in den Vacuolen vielleicht Kohlehydrate wie Glucose oder durch Polymerisation aus dieser entstandene Körper wie Dextran aufgespeichert werden. Dafür spricht wenigstens einigermaßen das außerordentlich starke Lichtbrechungsvermögen des Vacuoleninhaltes. Auf Nährbouillon, Hefewasser, Heudekokt, 2% Glucosewasser (hergestellt aus Leitungswasser, dem 0·02% saures Kaliumphosphat zugesetzt wurde) bildet der Sproßpilz zarte Häute, welche zumeist aus zierlichen Sproßverbänden von 4 bis 5 Zellen bestehen. Auch auf Bierwürze kommt es, aber nur hie und da zu einer solchen sehr schwachen Hautbildung, die Würze wird hiebei nur langsam zersetzt, es tritt nach und nach Trübung ein, zu eigentlichen Gärungserscheinungen kommt es jedoch nicht. In 2% Glucosewasser wurde die Vermehrungsfähigkeit des Pilzes festgestellt. Es wurden zu diesem Zwecke pro Kubikzentimeter dieser Lösung 200 Zellen ausgesäet. Nach 14 Tagen hatten sich dieselben auf 72,000.000 Zellen vermehrt. Die Vermehrungsfähigkeit beträgt demnach in diesem Nährsubstrate 360.000. Ähnliche Zahlen erhielt ich auch, als ich bei der Kultivierung nur reinen Luftstickstoff zur Kultur treten ließ. Dies gelang jedoch nur zu Anfang der Versuche, als die Hefe erst kurze Zeit auf künstlichen Nährböden gezüchtet wurde, später nahm das Vermehrungsvermögen wie auch die Stickstoffassimilation allmählich ab und werde ich später noch Gelegenheit haben, ausführlicher auf diese Degenerierung und ihre wahrscheinlichen Ursachen einzugehen. Ähnliche Beobachtungen haben ja auch Koch und andere bei *Azotobacter*-Kulturen gemacht.

B. Stickstoffbindung.

Da das Nährsubstrat nur sehr geringe Stickstoffmengen enthält, war anzunehmen, daß der Pilz bei seiner verhältnis-

mäßig hohen Vermehrungsfähigkeit zur Deckung seines Stickstoffbedarfes den Luftstickstoff heranzuziehen vermag.

Orientierende Versuche, die mit kleineren Flüssigkeitsmengen unter Ausschluß der in der Luft vorhandenen Stickstoffverbindungen vorgenommen wurden, ließen diese Annahme als gerechtfertigt erscheinen, so daß ich mich entschloß, die Versuche in größerem Maßstabe anzustellen und quantitativ auszuführen. Zu diesem Zwecke wurden größere, 1 *l* fassende Ehrlenmeyer- oder Rund-Kolben mit 300 cm^3 Glucosewasser beschickt. Die Kolben verschloß ein doppeltdurchlochter Kautschukstöpsel, durch dessen eines Bohrloch eine rechtwinkelige Röhre bis zum Boden des Gefäßes reichte, deren freies Ende mit einem Wattefilter verbunden war, während das andere Bohrloch ein kürzeres rechtwinklig abgebogenes Rohr aufnahm, das beim Versuche selbst mit einem Aspirator verbunden wurde. Die zutretende Luft wurde durch mehrere Absorptionsgefäße geleitet, die hintereinander Wasser, Natronlauge und Schwefelsäure enthielten, um einerseits die in der Luft vorhandenen Ammoniumverbindungen, wie kohlensaures Ammon, salpetrigsaures Ammon, salpetersaures Ammon zurückzuhalten, andrerseits auch das freie Ammoniak zu binden. Der Inhalt der Kolben wurde, nachdem er entsprechend sterilisiert worden war, mit je 200 Zellen pro Kubikzentimeter besäet und hierauf die Kolben mit dem Absorptionsapparat verbunden. Es wurde nun während je 2 Stunden 14 Tage lang mittels Aspirator kräftig Luft durch die Kulturflüssigkeit geleitet und der Inhalt nach dieser Zeit der Stickstoffbestimmung zugeführt. Während dieser Kultivierung traten in den Ruhepausen schwache Hautbildungen auf, die dann zu Boden sanken und ein ziemlich festliegendes Depot bildeten. Anfänglich wurden die Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt, doch erschien mir diese Methode zu ungenau, so daß ich mich bei der weiteren Folge der Dumas'schen Methode bediente. Beim Durchlesen der einschlägigen Literatur fand ich oft die Kjeldahl'sche Methode ganz merkwürdig beschrieben. So wurde in manchen Arbeiten bei der Zersetzung der organischen Substanzen mittels Schwefelsäure nicht bis zur vollständigen Mineralisierung, beziehungsweise bis zum völligen Klarwerden der schwefel-

sauren Lösung erhitzt, sondern das Erhitzen viel früher sistiert, dann gleich Natronlauge aufgefüllt und das zur Abscheidung gebrachte Ammoniak abdestilliert. Dadurch entstehen aber große Fehler, respektive Verluste. Um die Kjeldahl'sche Stickstoffbestimmung einwandfrei durchzuführen, erscheint es unbedingt geboten, die Substanz mit Schwefelsäure völlig einzudampfen, dann zu verkohlen und die gebildete Kohle vollständig zu zersetzen, um sämtliche Stickstoffsubstanzen in schwefelsaures Ammon zu überführen. Die Dumas'sche fand ich kaum in einer Arbeit angewendet, obwohl sie die Kjeldahl'sche an Genauigkeit übertrifft und bei einiger Übung ebenso leicht wie diese durchzuführen ist. Bei den meisten Arbeiten ist dies ja auch begreiflich, da es sich hier um den Nachweis der Stickstoffbindung durch Bakterien handelt und es fast unmöglich ist, die Bakterien durch Filtration ohne Verlust von dem Nährsubstrat zu trennen und aus diesem Grunde der Gesamtstickstoff der Nährlösung bestimmt werden muß, was nur nach der Kjeldahlschen Methode möglich ist. Aber auch bei der Feststellung der Stickstoffassimilation durch Schimmelpilze, wo eine einwandfreie Filtration leichter möglich wäre, erscheint in fast allen Fällen die Kjeldahl'sche Methode angewendet. Ich konnte die Dumas'sche Methode bequem zur Untersuchung heranziehen, da es sich mir um den Stickstoffwert der gebildeten Hefezellen selbst handelte und ich die Zellen verhältnismäßig leicht durch Filtration vom Nährsubstrate trennen konnte. Die Stickstoffbestimmung nach Dumas wurde unter Benützung folgender kleiner Varianten ausgeführt:

Nachdem die Hefe in der bereits geschilderten Weise durch 14 Tage herangezüchtet worden war, wurde der Kolbeninhalt durch ein Asbeströhrchen, dessen Asbestschichte mehrere Millimeter hoch mit reinem Kupferoxyd überschichtet wurde, filtriert. Die Filtration ging unter Benützung des Vakuums zwar etwas langsam vor sich, doch war sie in den meisten Fällen zufriedenstellend, da nur eine geringe Anzahl von Zellen, wie ich mittels der Thoma'schen Kammer feststellte, das Filter passierte und für die Genauigkeit der Stickstoffbestimmung nicht weiter in Frage kam. Später vereinfachte und verkürzte ich die Filtration dadurch, daß ich die über dem

Bodensatz stehende Flüssigkeit, die nur eine geringe Anzahl von Zellen enthielt, abgoß und von ihr das Volumen und die Zellenanzahl bestimmte. Da ich andrerseits die Zellenmenge und das Volumen des für die Stickstoffanalyse bestimmten Rückstandes feststellte, bedurfte es nur einer sehr einfachen Rechnung, um den Stickstoffgehalt dieser abgegossenen Zellen zu eruieren, den ich dann zum gefundenen, der Bodensatzhefe entsprechenden addierte. Die Stickstoffbestimmung wurde auf diese Weise auch quantitativ einwandfrei durchgeführt. Der Bodensatz wurde in genau derselben Weise, wie früher beschrieben, filtriert, hierauf kurz mit Wasser nachgewaschen, dann bei 95 bis 100° C. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und samt dem im Filterröhrchen befindlichen Kupferoxyd und Asbestpfropfen in ein Verbrennungsschiffchen gebracht. Hier wurden die getrockneten Hefezellen mit einer weiteren Menge von CuO gründlich vermischt, beziehungsweise bedeckt, und dann das Schiffchen in das Rohr eingeführt, sobald sich dessen vorderer Teil in kräftiger Rotglühhitze befand. Das Rohr war in üblicher Weise mit gekörntem und gepulvertem Kupferoxyd gefüllt und enthielt im vordersten Teile einen vor jeder Operation durch Methylalkohol frisch reduzierten Kupferstöpfel, um etwa gebildete Stickoxyde zu Stickstoff zu reduzieren.

Zum Auffangen des gebildeten Stickstoffes wurde ein Schiff'scher Azotometer benützt. Die bei der Verbrennung notwendige Kohlensäure wurde in einem Kipp'schen Apparat entwickelt, wobei die zur Erzeugung des CO_2-Gases verwendete Säure (HCl) vor dem Füllen zur Austreibung der gelösten Luft eine halbe Stunde lang erhitzt, sowie auch der verwendete Marmor zu gleichem Zwecke mehrere Stunden lang zuvor mit Wasser ausgekocht wurde.

Blinde Versuche, die genau in der geschilderten Weise ausgeführt wurden, ergaben im Azotometer eine durchschnittliche von KOH nicht absorbierbare Gasmenge von 0·4 cm^3, welche bei den eigentlichen Verbrennungen jedesmal in Abzug gebracht wurde. An dieser Zahl änderte auch ein vorhergehendes gründliches Evacuieren des Verbrennungsrohres nichts.

Wie ich schon weiter oben angedeutet habe, zeigt die Hefe eine allmähliche Abnahme sowohl was ihre Vermehrungs-

fähigkeit als auch was ihre Stickstoffbindung anlangt. Ähnliche Erfahrungen sind ja auch bei anderen oligonitrophilen Organismen, wie schon erwähnt, gemacht worden; als Ursache ist in diesem Falle speziell die ungewohnte Lebensweise auf den künstlichen, dem Pilze wahrscheinlich wenig zusagenden Nährböden anzusehen, die sich in ihrer Zusammensetzung wesentlich von seiner natürlichen Nahrung unterscheiden, wie aus seinem starken Auftreten auf Lorbeerblättern hervorgeht.

Nichtsdestoweniger war die Stickstoffassimilation auch nach mehrmonatiger Züchtung noch entsprechend und will ich die Resultate dieser Periode genauer ins Auge fassen, da sie in mehreren Analysen große Übereinstimmung aufweisen und kleine Fehler, die bei früheren Analysen gemacht wurden, nicht mehr enthielten.

Das Gewicht des im Azotometer gefundenen Stickstoffvolumens wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$G = \frac{V(h-w)}{760\,(1+0\cdot 00367\,t)} \cdot 0\cdot 001256,$$

in welcher G das Gewicht, V das beobachtete Volumen in Kubikzentimeter, h die Barometerhöhe und w die Spannung des Wasserdampfes bei der Temperatur t bedeuten.

Die Zahl 0·0012562 ist das Gesamtgewicht von 1 cm^3 Stickstoff bei 0° und 760 *mm* Barometerstand.

Erste Analyse.

In 300 cm^3 Kulturflüssigkeit gebildete Hefe enthielt nach 18 Tagen 2·2 cm^3 N bei 738·8 *mm* Druck und 19° C., also abzüglich der auch bei blinden Versuchen entstandenen 0·4 cm^3 = 1·8 cm^3 N. Diese Stickstoffmenge, umgerechnet auf 1 *l* Kulturflüssigkeit und laut obiger Gleichung ausgedrückt in Milligrammen N, ergibt für die pro 1 *l* Zuckerlösung entstandene, aus zirka 10.460 Millionen Zellen bestehende Hefemenge = 6·5 *mg* N.

Zweite Analyse.

In 300 cm^3 Kulturflüssigkeit gebildete Hefe enthielt nach 14 Tagen abzüglich 0·4 cm^3 1·4 cm^3 N bei 735·3 *mm* Druck

und 19° Temperatur. Es entspricht dies einem Stickstoffgehalt der in 1 *l* Kulturflüssigkeit gewachsenen Hefemenge = zirka 8000 Millionen Zellen von 5·1 *mg* Stickstoff. Es enthält demnach die bei diesen Zuchten entstandene Hefe —1 *g* Hefe bei der Kleinheit der Zellen zu zirka 8000 Millionen Zellen gerechnet — zirka 0·5 bis 0·6% Stickstoff. (Bei gewöhnlicher normaler Bier- oder Preßhefe sowie bei den fast gleich großen Sporen des Hausschwammes rechnet man 4000 bis 5000 Millionen Zellen pro Kubikzentimeter.)

Es ist dies ein verhältnismäßig sehr geringer Stickstoffgehalt, der wesentlich von dem normal ernährter Bier- oder Preßhefe abweicht. Wenn man aber die Bedingungen berücksichtigt, unter welchen die Stickstoffassimilation erfolgt und auf die ich gleich weiter unten näher eingehen werde, so erscheinen diese Zahlen nicht ganz unbegreiflich. Aber nicht allein der Stickstoffgehalt der in Glucoselösung gewachsenen Hefezellen sondern auch der an der Oberfläche von Glucoseagar entstandenen Zellen ist verhältnismäßig niedrig, jedenfalls niedriger als der von gewöhnlicher Bierhefe, wie aus folgender Analyse hervorgeht.

Dritte Analyse.

Gewicht der bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Hefe = 79·5 *mg*; gefundener N-Gehalt nach Abzug von 0·4 cm^3 Versuchsfehler = 2·2 cm^3 bei 747 Druck und 20° C., daher N-Menge in Prozent = **3·1**%. Dieser Zahl gegenüber enthielten verschiedene an der Münchner wissenschaftlichen Station untersuchte Bierhefen 6 bis 9% N, wobei zu bemerken ist, daß der Stickstoffgehalt während der Gärung allmählich abnimmt. Es ist dies auch begreiflich, da zu Anfang der Gärung der Hefe leicht assimilierbare Stickstoffsubstanzen in größerem Maße zur Verfügung stehen als am Schlusse derselben. Die zuerst gebildeten Zellen werden größere Stickstoffmengen enthalten als die Epigonen derselben, die sich erst am Schlusse der Gärung gebildet haben oder allgemein ausgedrückt, die Hefe wird nicht immer dieselbe Zusammensetzung besitzen, sondern sie wird je nach den Verhältnissen, unter welchen sie wächst, besonders nach der Art ihrer Ernährung sowie nach der Art

der Hefe im Stickstoffgehalte schwanken (105). Boullanger (106) fand weiters in Bierhefen unter verschiedenen Ernährungsbedingungen 5 bis 9% N.

Für Preßhefe sind Unterschiede von 3·9 bis 10% N (106), also noch größere Differenzen im N-Gehalt als bei Bierhefen gefunden worden. Auch ich habe im Laufe der Arbeit eine Preßhefe, deren mikroskopische Untersuchung keine nennenswerten Mengen von Fremdorganismen und Stärkekörnern ergab, auf ihren N-Gehalt untersucht und denselben zu 5·2% gefunden, wie aus folgender Analyse ersichtlich ist.

Vierte Analyse.

Gewicht der Hefetrockensubstanz 127 *mg*. Volumen des N-Gases 6·4 cm^3 bei Barometerstand 740·9 und 18° C.

Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, sind die Schwankungen im Stickstoffgehalt schon bei normal ernährter Hefe, die über leicht assimilierbare N-Nahrung verfügt, ziemlich bedeutende, es dürfte demnach umso begreiflicher erscheinen, daß bei ganz abnormaler Ernährung noch größere Schwankungen vorkommen und der N-Gehalt auf ein Minimum herabsinkt. Auf Agar ist der N-Gehalt der untersuchten Hefe verhältnismäßig ein ziemlich hoher und erreicht mit seinen 3·1% N beinahe die niedersten Werte von Preßhefe mit 3·9%. Hier waren die Kulturbedingungen für die Hefe besonders günstige, denn die Hefe wuchs nur an der Oberfläche des Nährsubstrates und konnte den Luftstickstoff in vollem Maße bei Deckung ihres N-Bedarfes ausnützen. In den Zuckerlösungen dagegen waren die Bedingungen, unter welchen N aufgenommen werden konnte, äußerst ungünstige. Die Stickstofflöslichkeit in Wasser und wahrscheinlich auch in Glucoselösung ist ja eine außerordentlich geringe (1 Volumen Wasser löst bei 760 *mm* Druck und 15° C. 0·01682 Volumen N). Die Hauptmenge der Zellen ist auf diese verhältnismäßig geringe N-Menge bei dem Aufbau ihres Körpereiweißes angewiesen, da die meisten Zellen am Boden des Gefäßes zur Entwicklung kommen und nur eine geringe Anzahl von Zellen sich an der Oberfläche der Flüssigkeit entwickelt. Dazu kommt noch die Unbeweglichkeit der Hefe, die Zellen vermögen nicht wie *Clostridium pastorianum* oder *Azotobacter*

ihre Lage zu verändern und sich so den Stickstoff in den oberen Schichten der Nährlösung nutzbar zu machen, sondern sie sind tatsächlich auf die nur sehr geringen N-Mengen angewiesen, die sich am Boden der Kulturflüssigkeiten vorfinden. Daß die Hefe tatsächlich den Luftstickstoff zu assimilieren vermag, geht weiters noch aus folgenden drei Parallelversuchen hervor, bei welchen eine Züchtung der Hefe in der gleichen Nährlösung (Glucosewasser) und bei gleicher Zellenaussaat (200 Zellen pro Kubikzentimeter) einmal unter Durchleiten filtrierter Luft, ein zweites Mal unter Durchleiten von reinem Sauerstoff, ein drittes Mal unter Durchleiten eines Gemisches von Sauerstoff und Kohlensäure in dem Verhältnis 1:4 versucht wurde. Während im ersten Falle die Hefezahl pro 300 cm^3 Kulturflüssigkeit auf 3100 Millionen Zellen gestiegen war, hatten sich im zweiten Falle nur 180,000.000 Zellen entwickelt und im dritten Falle war ein Wachstum oder eine Vermehrung der Hefe überhaupt ganz ausgeblieben. Man ersieht hieraus, daß sich die weitaus größte Zahl der Hefezellen, zirka 94 $^0/_0$, auf Kosten des Stickstoffes der Luft entwickelt hatte, während, wie aus dem zweiten Versuch hervorgeht, nur eine sehr geringe Menge von Hefezellen, etwa 6 $^0/_0$ auf Kosten der geringen Mengen gelöster N-Substanzen entstanden war. Im dritten Falle war ein Wachstum der Hefe überhaupt ganz ausgeblieben, da ihr die stark mit CO_2 gesättigte Zuckerlösung ohne nennenswerte Stickstoffnahrung nicht zusagte.

Es war nun noch weiter interessant zu wissen, wie sich die N-Assimilation zur verbrauchten Zuckermenge verhielt. Zu diesem Zwecke wurden in der ursprünglichen Zuckerlösung wie in den von der Hefe zersetzten Glucoselösungen Zuckerbestimmungen, und zwar nach Allihn ausgeführt. Man verfährt hiebei in der Weise, daß in einer mit einem Deckel verschließbaren Porzellanschale ein Gemenge von 30 cm^3 Kupfersulfatlösung (69·278 *g* $CuSO_4$ in 1 *l* Wasser), 30 cm^3 Seignettesalzlösung (346 *g* Seignettesalz und 250 *g* KOH zu 1000 cm^3 gelöst) und 60 cm^3 Wasser zum Sieden erhitzt und 25 cm^3 der genau fünffach verdünnten und filtrierten Zuckerlösungen dazugegeben werden. Nachdem die Flüssigkeit 2 Minuten lang bei geschlossenem Deckel im Sieden erhalten

wurde, wird sie sogleich möglichst rasch durch ein Asbeströhrchen filtriert, der Kupferniederschlag zuerst sehr gut mit Wasser, später mit Alkohol und Äther gewaschen. Nach gründlicher Trocknung im Trockenkasten werden die Röhrchen unter Durchleiten von reinem Wasserstoff erhitzt, hierdurch der Niederschlag vollständig reduziert und nach entsprechender Abkühlung in der Wasserstoffatmosphäre als metallisches Kupfer gewogen.

Analysen.

1. Ursprüngliche Zuckerlösung.

25 cm^3 der fünffach verdünnten Zuckerlösung ergaben 154·6 *mg* Cu, daher waren in 1000 cm^3 der ursprünglichen Zuckerlösung 18·92 *g* Glucose vorhanden. Diese Zahl weicht um etwas mehr als 1 *g* von der zur Lösung verwendeten Glucosemenge ab, indem ursprünglich 2% Lösungen hergestellt wurden, doch läßt sich die Differenz dahin erklären, daß während des Sterilisierens sich eine geringe Menge eines unlöslichen Kalksaccharates ausgeschieden hatte, die gleich nach der Ausscheidung durch Filtration entfernt wurde.

2. Zuckerlösung von Versuch 1 (siehe oben).

25 cm^3 der fünffach verdünnten Zuckerlösung ergaben 132·9 *mg* Cu, daher in 1000 cm^3 der Kulturlösung selbst 16·22 *g* Glucose, also Zuckerabnahme 2·7 *g* Glucose, welche durch die Hefe aufgezehrt wurden.

Setzt man diese Zuckermenge mit dem aufgenommenen N in Relation, so ergibt sich das Verhältnis 2·7 *g* verbrauchte Glucose zu 6·5 *mg* N oder 1 *g* Glucose zu 2·4 *mg* N.

3. Zuckerlösung von Versuch 2.

25 cm^3 der fünffach verdünnten Zuckerlösung ergaben 136·7 *mg* Cu, daher in 1000 cm^3 der Kulturflüssigkeit selbst 16·73 *g* Glucose, also Zuckerabnahme 2·19 *g* Glucose. In diesem Falle verhielt sich das Verhältnis von Zucker zum aufgenommenen Stickstoff wie 2·19 *g* Glucose : 5·1 *mg* N oder 1 *g* Zucker : 2·3 *mg* N. In beiden Analysen ist also das Verhältnis zwischen Zucker und Stickstoff sehr ähnlich und kommt

auch der Relation nahe, in welcher diese beiden Faktoren bei Azotobakter hie und da zueinander stehen. Wie aus der verhältnismäßig geringen Zuckermenge weiters hervorgeht, die während des Versuches von dem Pilze assimiliert wurde, gehört derselbe zu den schwach vergärenden Hefen. Von deutlichen Gärerscheinungen mit Bildung von Gas konnte überhaupt nichts gesehen werden, und zwar nicht allein in der Glucoselösung, sondern auch bei der Kultivierung der Hefe in Würze. Es traten auch hier wohl sehr bald Trübungen auf, die nach einigen Tagen ein gewisses Maximum erreichten, doch kam es nicht zur Bildung eines kräftigen Depots, wie es bei normalen Gärungshefen beobachtet wird, und deutliche Gärerscheinungen blieben ganz aus. In dieser Richtung sowie auch in anderen hat die Hefe große Ähnlichkeit mit gewissen *Torula*-Arten. Es sind dies Pilze, die keine Endosporen bilden und keine typische Schimmelvegetation entwickeln. Sie zählen in bezug auf Alkoholproduktion zu den schwach vergärenden Hefen, die zumeist keine deutlichen Gärerscheinungen erkennen lassen und, einzelne ausgenommen, bis höchstem 1$^0/_0$ Alkohol bilden. Die meisten *Torula*-Arten besitzen zwar eine mehr weniger kugelige Gestalt, doch sind einzelne auch, als länglich gestaltet, beschrieben worden. Hansen und andere haben verschiedene *Torulaceen* in Erde, in Blüten, auf feuchten Getreidefrüchten, auf Blättern, in großer Menge auch in der Haarkleidung von überwinterten Bienen und Wespen, sowie in deren Wohnungen gefunden. Die ganze Gruppe ist vorläufig noch nicht weiter charakterisiert und nehme ich daher keinen Anstand, die neue Hefe zu den *Torulaceen* zu rechnen, da sie noch am besten in diese Gruppe der Fungi imperfecti paßt.

Um meiner großen Verehrung für Herrn Hofrat Wiesner Ausdruck zu verleihen, auf dessen Vorschlag und Anraten hin die Untersuchung des Laublattfalles in biologisch-mykologischer Richtung vorgenommen wurde und die zur Entdeckung dieser Hefe führte, nenne ich sie daher *Torula Wiesneri*.

Im Anschluß an das Gesagte sei noch mitgeteilt, daß ich im Verlauf der Arbeit auch noch andere Hefen auf nahezu stickstofffreiem Glucoseagar zu züchten versuchte, um ihre Fähigkeit, auf diesem Nährboden zu wachsen, kennen zu

lernen. In folgendem habe ich die diesbezüglichen Resultate zusammengestellt:

Es wuchsen kräftig: *Willia anomala, Willia saturnus,* ziemlich kräftig: *Mycoderma cerevisiae, Mycoderma rubra, Pichia farinosa.* Es sind dies sämtlich Hefen, welche auf Flüssigkeiten kurz nach der Einsaat Häute bilden, als sehr luftliebend bekannt sind und unter dem Namen Kahmhefen vereinigt werden. Schon schwächer gediehen *Torula alba, Saccharomyces* Frohberg, *Saccharomycodes Ludwigii,* gar nicht *Saccharomyces termantitonus, Saccharomyces pastorianus, Saccharomycopsis capsularis* und endlich die *Apiculatus*-Hefe.

Von zwei der genannten Kahmhefen, und zwar von *Willia anomala, Willia saturnus* ist aus einer Arbeit Hermann's, die jedoch noch nicht publiziert wurde, erwiesen, daß auch sie in Glucosewasser sehr üppig gedeihen und in dieser nahezu stickstofffreien Nährlösung sehr kräftige Häute bilden.

Zusammenfassung.

Unterzieht man vorliegende Arbeit einer kurzen Perlustration, so geht aus ihr hervor, daß neben anderen oligonitrophilen Organismen, wie vorzüglich Bakteriaceen, auch vereinzelte auf Blättern vorkommende Blastomyceten oder Sproßpilze befähigt sind, den Luftstickstoff zu assimilieren und dadurch zur Stickstoffanreicherung im Boden nach dem Laubblattfall beizutragen vermögen. Die untersuchte Hefe hat zwar kein besonders hohes Stickstoffbindungsvermögen, jedoch vermag sie immerhin in stickstofffreien Glucoselösungen pro Gramm aufgenommenen Zuckers zirka 2·3 bis 2·4 *mg* Stickstoff zu assimilieren. Auf der Oberfläche von stickstofffreiem Glucoseagar gezüchtet, erreicht ihr durchschnittlicher Stickstoffgehalt 3·1% und kommt dem normal ernährter Preßhefe am Schlusse einer Gärung mit 3·9% ziemlich nahe.

Die untersuchte Hefe ist als Fungus imperfectus anzusprechen, da derselben die Fähigkeit, Asci zu

bilden, so weit es eben die Versuche überblicken ließen, fehlt. Sie findet vorläufig ihre Zuteilung bei den Torulaceen und wurde *Torula Wiesneri* genannt.

Literaturverzeichnis.

1. Hellriegel, Über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen, 1888.
2. Winogradsky, Comptes rendus de l'Académie, 1893.
3. Kühn, Frühling's Landwirtschaftliche Zeitung, 1901, siehe auch Lafar.
4. Henry, Journal d'agriculture pratique, 1897, II, p. 411.
5. Montemartini, Stationi agrari sperimentali, XXXVIII, p. 1060 bis 1065.
6. Süchting, Amtsblatt der Landwirtschaftskammer für Kassel, 1905.
7. Berthelot, Chimie végétale et agricole, Tome I, 1899.
8. Deherain, Annal. agronom., 1896, Bd. 21, 353, siehe auch Lafar.
9. Tacke, Landwirtschaftliche Jahrbücher, 1889, Bd. 18, p. 453, siehe auch Lafar.
10. Winogradsky, Comptes rendus de l'Académie, 1893, Bd. 116, p. 1385; ebenda, 1894, Bd. 118, p. 353; Archives des Sciences biol., publ. par l'Institut imp. de méd. exp. à St. Pétersbourg, 1895, Bd. 3, p. 297; — Zentralbl. für Bakt. 2. Abt., 1902, Bd. 9, p. 43, siehe auch Lafar.
11. Beijerinck, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, p. 561.
12. Beijerinck und van Delden, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, p. 3.
13. Koch, Verhandlungen der Gesellschaft der Naturforscher und Ärzte, 1902, allg. Teil.
14. Gerlach und Vogel, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, p. 817.
15. Freudenreich v., Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, 514.

16a. Löhnis, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XIV, p. 582, 713.
16b. Löhnis und Westermann, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XXII, p. 234.
17. Lipmann, New-Yersey State agricultural station, 1904.
18. Perotti, Annal. di botanica, 1906, p. 213 bis 217.
19. Pillai, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XIX, p. 87 bis 96.
20. Kruyff de, Bull. du Dép. d'agriculture aux Indes néerland., Nr. IV, 1906, p. 9.
21. Kaserer, Zeitschr. für das landwirtschaftliche Versuchswesen in Österreich, 1907, p. 37.
22. Löhnis und Pillai, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., Bd. XX, p. 799.
23. Volpino, Estratto dalla Rivista d'igiene e sanità publica, XVI, 1905.
24. Jacobitz, Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankheiten, XLV, p. 97.
25. Benecke und Keutner, Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, XXI, p. 333.
26. Keutner, Wissenschaftliche Meeresuntersuchung, Abt. Kiel, Bd. XVIII.
27. Keding, Wissenschaftliche Meeresuntersuchung, Abt. Kiel, neue Folge, Bd. IX.
28. Pringsheim, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XVI, p. 795.
29. Pringsheim, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XX, p. 248.
30a. Haselhoff und Bredemann, Landwirtschaftliche Jahrbücher, Bd. XXXV, 1906, p. 381.
30b. Bredemann, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XXII, p. 44.
31. Reinke, Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, 1903, Bd. 21, p. 371.
32. Gerlach und Vogel, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, p. 817.
33. Gautier und Drouin, Comptes rendus de l'Académie, 1892, Bd. 114, p. 19.
34. Löw-Bredig, Anorganische Fermente, 1901, Leipzig, Engelmann, siehe auch Lafar.
35. Schneider, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XVIII, p. 321.
36. Wilfarth und Wimmer, Landwirtschaftliche Versuchsstation, Bd. LXVII, 1907.

37. Fischer, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., Bd. XIV, p. 33, und daselbst, Bd. XV, p. 235.
38. Krzemieniewski, Severin und Helene, Krakauer Akademie der Wissenschaften, 1906, Nr. 7, p. 560 bis 577.
39. Remy, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XVIII, p. 315.
40. Koch, Litzendorf, Krall und Alvez, Journal für Landwirtschaft, Bd. LV, p. 355.
41. Krainsky, Ref. Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XX, p. 725.
42. Stocklasa, Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, XXIV, 1906, p. 22 bis 32.
43. Krzemieniewski, Krakauer Akademie der Wissenschaften, 1907, p. 646.
44. Stocklasa, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XXI, p. 484 und 620.
45 Berthelot, Chimie végétale, Tome I, 1899.
46. Puriewitsch, Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, 1895, Bd. 13, p. 339.
47. Saida, Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, 1901, Bd. 19, p. 107.
48. Koch, siehe Lafar, Kreislauf des N, p. 12.
49. Heinze, Landwirtschaftliche Jahrbücher, XXXV, p. 889.
50. Ternetz, Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, Bd. XLIV, Heft 3.
51. Fröhlich, Pringsheim's Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, XLV, 1907, p. 256.
52. Frank, Landwirtschaftliche Jahrbücher, 1888, p. 421.
53. Schlösing und Laurent, Comptes rendus de l'Académie, 1891, Bd. 113 und 1892, Bd. 115.
54. Kossowitsch, Bot. Zeitg., 1894, Bd. 52, p. 97.
55. Fischer Hugo, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XII, p. 267.
56. Heinze, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XVI, p. 640, 703.
57. Krüger und Schneidewind, Landwirtschaftliche Jahrbücher, 1900, Bd. 29, p. 771.
58. Siehe sub Nr. 25 dieses Literaturnachweises.
59. Liebscher, Journal für Landwirtschaft, 1893, Bd. 41, p. 319.
60. Petermann, Koch's Jahrbuch, Bd. 3, p. 206.

61. Atwater und Woods, Am. Chem. Journal, 1890, Vol. 12, p. 526.
62. Petermann, Recherches de chimie et physiolog. appliquées à l'agriculture, Paris 1895.
63. Stocklasa, Landwirtschaftliche Jahrbücher, 1895, p. 6.
64. Jamieson, Agricultural Association Aberdeen, 1905.
65. Boussingault, Agronomie, chimie, agriculture, 1860, Bd. I.
66. Hellriegel, Zeitschr. des Vereines für Zuckerindustrie des Deutschen Reiches, 1886, p. 863.
Wilfarth, Koch's Jahrbuch 1890, Bd. 1, p. 131.
Hellriegel und Wilfarth, Beiheft des Vereines für Rübenzuckerindustrie, 1888, Nov.
67. Malpighi Opera omnia, Leiden 1867, II, p. 126.
68. Woronin, Mémoires de l'Acad. des sciences de St. Pétersbourg, 1866.
69. Beijerinck, Bot. Zeitg., 1888, Bd. 46, p. 725.
70. Frank, Landwirtschaftliche Jahrbücher, 1890, Bd. 19, p. 544.
71. Hiltner und Hotter, Landwirtschaftl. Versuchsstation, 1894, Bd. 45, p. 1, siehe auch Lafar.
72. Nobbe und Hiltner, Landwirtschaftl. Versuchsstation, 1894, Bd. 45, p. 155, siehe auch Lafar.
73. Kirchner, Beitrag zur Biologie der Pflanzen, 1895, Bd. 7, p. 213.
74. Hiltner und Stöhrmer, Arbeiten aus der biolog. Abt. des k. Gesundheitsamtes, 1903, Bd. 3, p. 151.
75. Mazé, Annales Pasteur, 1896, Bd. 10, p. 287.
76. Hiltner, Forstliche naturwiss. Zeitschrift, 1898.
77. Siehe Nr. 74.
78. Gerlach und Vogel, Zentralbl., 2. Abt., XX, p. 70, 1908.
79. Rodella, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XVIII, p. 459.
80. Gino de Rossi, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., XVIII, p. 482.
81. Brunchorst, Unters. aus dem bot. Inst. Tübingen, Dissert., 1886, p. 151.
82. Beijerinck, Bot. Zeitg., 1888, Bd. 46, p. 725.
83. Hiltner, Arbeiten aus der biolog. Abt. des k. Gesundheitsamtes, 1900, Bd. 1, p. 177.
84. Woronin, siehe 68.

85. Möller, Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, 1885 und 1892.
86. Brunchorst, siehe 81.
87. Frank, Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, 1891, Bd. 9, p. 244.
88. Hiltner, Landwirtschaftl. Versuchsstation, 1895, Bd. 46, p. 153.
89. Shibata, Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, 1902, Bd. 37, p. 643.
90 *a*. Bjorkenheim, Zeitschr. für Pflanzenkrankheiten, 1904, p. 129 bis 133.
90 *b*. Zach, F. Diese Sitzungsberichte, Bd. CXVII, 1908.
91. Siehe 81.
92. Wahrlich, Inaug. Dissert., Straßburg, 1886.
93. Reeß, Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, 1885, Bd. 3, p. 293.
94. Kamienski, Bot. Zeitg., 1881, Bd. 39, p. 457.
95. Frank, Bot. Zeitg., 1879, Bd. 37, p. 832.
96. Tubeuf, Forstlichnaturwiss. Zeitschrift, 1896, p. 43.
97. Schlicht, Inaug. Dissert., Erlangen, 1889.
98. Janse, Extrait des Annales du Jardin botanique de Buitenzorg, 1896.
99. Stahl, Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, 1900, Bd. 34, p. 539.
100. Nobbe und Hiltner, Landwirtschaftl. Versuchsstation, 1898, Bd. 51, p. 241.
101. P. E. Müller, Naturwiss. Zeitschr. für Land- und Forstwirte, 1903, Bd. 1, p. 289.
102. Möller, Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, Bd. XXIV, p. 230 bis 233.
103. Nestler, Diese Sitzungsberichte, Bd. CXIII. Abt. I., p. 529 bis 546.
104. Ternetz, Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, Bd. XLIV, Heft 3.
105. Siehe »Stickstoffernährung der Hefe« von Pringsheim, Zentralbl. für Bakt., 2. Abt., Bd. XIX, p. 310.
106. F. Thausing, Die Malzbereitung und Bierfabrikation, p. 790.